

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Papel de PAS quinasa en la adaptación a diferentes estados
nutricionales y en la resistencia a la obesidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana Pérez García

Directoras

**Elvira Álvarez García
María del Carmen Sanz Miguel
Verónica Hurtado Carneiro**

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**PAPEL DE PAS QUINASA EN LA ADAPTACIÓN A DIFERENTES
ESTADOS NUTRICIONALES Y EN LA RESISTENCIA A LA OBESIDAD**

ANA PÉREZ GARCÍA

MADRID, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**PAPEL DE PAS QUINASA EN LA ADAPTACIÓN A DIFERENTES
ESTADOS NUTRICIONALES Y EN LA RESISTENCIA A LA OBESIDAD**

MEMORIA PRESENTADA POR

ANA PÉREZ GARCÍA

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. ELVIRA ÁLVAREZ GARCÍA

DRA. MARÍA DEL CARMEN SANZ MIGUEL

DRA. VERÓNICA HURTADO CARNEIRO

MADRID, 2018



Dña. **ELVIRA ÁLVAREZ GARCÍA**, profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

Dña. **MARÍA DEL CARMEN SANZ MIGUEL**, profesora contratada doctor del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y

Dña. **VERÓNICA HURTADO CARNEIRO**, contratada por el Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM).

CERTIFICAN:

Que la licenciada Dña. **Ana Pérez García** ha alcanzado la formación y los conocimientos suficientes durante el periodo de doctorado para la realización del trabajo titulado: **“PAPEL DE PAS QUINASA EN LA ADAPTACIÓN A DIFERENTES ESTADOS NUTRICIONALES Y EN LA RESISTENCIA A LA OBESIDAD”**, bajo nuestra dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid para optar al grado de Doctor.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expiden el presente certificado en Madrid, a 9 de Marzo de 2018.

Vº Bº de los Directores

Fdo.: Dra. Elvira Álvarez García

Fdo.: Dra. María del Carmen Sanz Miguel

Fdo.: Dra. Verónica Hurtado Carneiro

Llegado este momento me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral y me han apoyado durante todo este tiempo, aunque no sería suficiente solo con decir gracias.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras de tesis la Dra. Elvira Álvarez, la Dra. Carmen Sanz y la Dra. Verónica Hurtado por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por poder trabajar con ellas y por el gran ambiente de trabajo. Elvira, gracias por tu esfuerzo, tus enseñanzas y por dedicar tu tiempo en ayudarme en avanzar en el mundo de la investigación. Carmen, gracias por tu apoyo, por todo lo que me has enseñado y por intentar siempre conseguir lo mejor para mí. A Vero, mi antecesora, gracias por todos tus conocimientos y experiencias en el laboratorio, por tu cariño y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

También quería agradecer al Dr. Enrique Blázquez por permitirme formar parte de su grupo de investigación. Y a las técnicas del departamento, Inés, Cynthia y María Ángeles por su ayuda durante estos años junto con los profesores del departamento que de alguna manera han colaborado en la realización de esta tesis.

A la Dra. Laura Frago por darme la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio del Hospital Niño Jesús.

A Pilar, mi compañera, esta tesis no hubiera sido igual sin ti. Gracias por todos los momentos vividos, por tus risas, por nuestras conversaciones, por tus consejos, por tu ayuda y por ser la persona que mejor me ha entendido durante este tiempo.

A Nuria, gracias por ser de lo mejor que me ha dado estos años, porque en ti he encontrado una gran amiga. Por todo lo que hemos compartido y, por supuesto, por todo lo que nos queda por vivir juntas. Por tu cariño, por comprenderme y por permitirme conocer a grandes personas (Ana, Teresa y María).

A los chicos, Ángel y Yannick, por hacer los días más amenos. Ángel, gracias por ser siempre tan servicial, y Yannick, gracias por compartir esta experiencia conmigo.

A mis biólogas, Pilar, Patri, Nai, Marta, Laura y Bego porque con vosotras empezó mi andadura en este mundo y juntas empezamos a valorar la biología (y lo que no era la biología).

A Carmen Zarate por nuestros domingos alternativos y de baloncesto que me permitían desconectar de la tesis.

Especialmente quería dar las gracias a mi familia.

A César, gracias por tu apoyo, por tener siempre palabras positivas y de ánimo hacia a mí, por estar siempre dispuesto a escuchar mis problemas, por tu ayuda sin esperar nada a cambio y por tu cariño.

A mi hermano Javi por ser mi mejor compañía durante estos años, si no hubiera vivido contigo no hubieran sido iguales. Gracias por tu tranquilidad, por tu alegría, por aguantarme y por ser una de las personas que más confía en mí. A Claudia por compartir y entender el “apasionado” mundo de la ciencia.

A mis padres porque sin ellos no hubiera sido posible esta tesis. Gracias por todo vuestro esfuerzo y trabajo para permitir llegar hasta donde he llegado. Por quererme tanto, por apoyarme en cualquier situación y por permitirme conseguir todas mis metas. Sé que siempre voy a poder contar con vosotros.

iiiGRACIAS!!

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	7
SUMMARY	13
INTRODUCCIÓN	19
1 PAPEL DEL HÍGADO EN LOS DISTINTOS ESTADOS NUTRICIONALES.....	21
1.1 Rutas metabólicas hepáticas activadas en respuesta al ayuno	25
1.1.1 Metabolismo glucídico	26
1.1.2 Metabolismo lipídico.....	30
1.2 Rutas metabólicas hepáticas activadas en estado postprandial.....	32
1.2.1 Metabolismo glucídico	33
1.2.2 Metabolismo lipídico.....	34
1.2.3 Ruta de la Insulina	38
2 LA GLUCOQUINASA (GCK)	41
2.1 Regulación de la GCK.....	42
2.2 GCK y homeostasis de glucosa y lípidos	45
3 PROTEÍNA QUINASA CON DOMINIOS PAS (PASK).....	46
3.1 Estructura y regulación	46
3.2 Papel de PASK como regulador energético.....	48
4 REGULACIÓN POR microARNs (miARNs).....	50
4.1 miARNs y enfermedades metabólicas	51
5 DIABETES, OBESIDAD Y ALTERACIONES HEPÁTICAS	52
6 AGENTES ANTIDIABETOGÉNICOS. PAPEL DEL PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1)	55
6.1 Estructura del GLP-1.....	55
6.2 Regulación de la secreción del GLP-1 y mecanismo de acción	56
6.3 Acciones fisiológicas.....	58
6.4 Agonistas del receptor de GLP-1 y su papel en obesidad	59
OBJETIVOS	61
MATERIALES y MÉTODOS	65
1 EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	67
1.1 Animales de experimentación.....	67

Índice

1.2	Dieta rica en grasa	67
1.3	Test de tolerancia a insulina (TTI) y test de tolerancia a glucosa (TTG)	68
1.4	Tratamiento y extracción de órganos.....	68
2	DETERMINACIONES EN SANGRE	69
2.1	Análisis de los niveles de insulina en plasma	69
2.2	Perfil lipídico hepático	70
3	EXPRESIÓN GÉNICA	70
3.1	Extracción de ARN hepático y síntesis de ADNc.....	70
3.2	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) (TaqMan® Assay)	72
3.3	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) (SYBR Green® Assay)	73
4	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE microARNs (miARNs)	74
4.1	Extracción de ARN hepático	74
4.2	Retrotranscripción	75
4.3	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) (SYBR Green® Assay)	75
5	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS, SDS-PAGE Y WESTERN BLOT	76
6	ACTIVIDAD GLUCOQUINASA	78
7	LOCALIZACIÓN NUCLEO/CITOPLASMA DE LA GLUCOQUINASA (GCK).....	79
8	VISUALIZACIÓN DE ESTRUCTURAS SUBCELULARES.....	81
9	TINCIÓN OIL RED	82
10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	82
	RESULTADOS	83
1	CARACTERIZACIÓN DE RATONES DEFICIENTES EN PASK (<i>Pask</i> ^{-/-})	85
2	RESPUESTA DE LA GLUCOQUINASA HEPÁTICA Y SU PROTEÍNA REGULADORA A CONDICIONES DE AYUNO Y ALIMENTACIÓN. EFECTO DE LA EXENDINA-4 (Ex4).....	86
2.1	Regulación de la expresión de la glucoquinasa y la proteína reguladora de la glucoquinasa por ayuno/alimentación.....	86
2.2	La expresión de las proteínas GCK y GCKR se encuentra alterada en ratones <i>Pask</i> ^{-/-}	88
2.3	La acción de la Ex4 sobre la expresión de la GCK es dependiente de PASK.....	90
2.4	Regulación de la localización subcelular de la GCK por ayuno y alimentación	92
2.5	La actividad de la GCK hepática está alterada en ratones <i>Pask</i> ^{-/-}	93
3	REGULACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y ENZIMAS DE LAS PRINCIPALES VÍAS METABÓLICAS HEPÁTICAS EN RESPUESTA A ESTADOS DE AYUNO/ALIMENTACIÓN	94
3.1	La deficiencia de PASK alteró la regulación de la expresión de diferentes genes hepáticos por ayuno/alimentación	95

3.2	La deficiencia de PASK modificó la adaptación de las proteínas PGC1 α y PEPCK a ayuno/alimentación	98
3.3	La deficiencia de PASK alteró la ruta de señalización de la insulina en respuesta a ayuno/alimentación	99
3.4	Alteración de la maduración de SREBP1 en ratones <i>Pask</i> ^{-/-}	101
4	EFFECTO DE LA EXENDINA-4 (Ex4) EN LA FUNCIÓN HEPÁTICA	103
4.1	La Ex4 regula la expresión de la enzima PASK a nivel hepático	103
4.2	Regulación de la expresión de enzimas y factores de transcripción por Ex4.....	104
4.3	Regulación de la expresión de la proteína PEPCK por Ex4 en condiciones de ayuno/alimentación	107
4.4	Efecto de la Ex4 en la señalización de la insulina en ratones <i>Pask</i> ^{-/-}	108
5	OBESIDAD INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN GRASA.....	110
5.1	Resistencia de ratones <i>Pask</i> ^{-/-} a las alteraciones provocadas por una dieta rica en grasa	111
5.2	La deficiencia de PASK mejora la homeostasis de glucosa y la sensibilidad a insulina en ratones alimentados con HFD	112
5.3	La deficiencia de PASK protege del aumento de los niveles de insulina y colesterol y del acúmulo de lípidos hepáticos inducidos por HFD	114
6	LA DIETA RICA EN GRASA ALTERÓ LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>Pask</i> POR CAMBIOS NUTRICIONALES	116
7	LA DEFICIENCIA DE PASK ALTERÓ LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1	117
8	REGULACIÓN DE LA GLUCOQUINASA Y SU PROTEÍNA REGULADORA POR HFD.....	118
8.1	La deficiencia de PASK provoca una alteración en la expresión de <i>Gck</i> y <i>Gckr</i> con HFD y en la regulación por ayuno/alimentación	118
8.2	La deficiencia de PASK provoca la alteración de la expresión de las proteínas GCK y GCKR con HFD y su regulación por ayuno/alimentación	120
8.3	La HFD alteró la localización subcelular de la GCK.....	121
8.4	La actividad glucoquinasa se encuentra alterada en ratones <i>Pask</i> ^{-/-}	122
9	EFFECTO DE LA HFD EN LA ADAPTACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y ENZIMAS HEPÁTICAS A AYUNO Y ALIMENTACIÓN	123
9.1	HFD modifica la respuesta de genes metabólicos hepáticos a ayuno y alimentación y la deficiencia de PASK contrarresta las alteraciones provocada por HFD	124
9.2	La expresión de la proteína PEPCK fue alterada con HFD.....	127
9.3	HFD alteró la señalización de la insulina en respuesta a ayuno/alimentación	128
10	LA MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE microARN (miARN) POR HFD FUE DEPENDIENTE DE PASK	130
11	EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE PASK Y LA HFD EN EL NÚMERO DE MITOCONDRIAS.....	132
	DISCUSIÓN.....	135

Índice

1	PASK Y EL ESTADO NUTRICIONAL	137
2	PAPEL DE PASK EN LA ADAPTACIÓN DE LA GCK A AYUNO/ALIMENTACIÓN.....	138
3	PAPEL DE PASK EN LA ADAPTACIÓN A CAMBIOS NUTRICIONALES.....	140
4	EFFECTO DE LA EXENDINA-4 (Ex4) Y PASK EN LA ADAPTACIÓN A CAMBIOS NUTRICIONALES.	147
5	PAPEL DE LA PASK EN LA ADAPTACIÓN AYUNO/ALIMENTACION CON HFD	151
6	FUNCIÓN DE PASK EN LA REGULACIÓN DE microARNs (miARNs) CON HFD	157
7	MITOCONDRIAS Y PASK.....	160
CONCLUSIONES		163
BIBLIOGRAFÍA		167
ANEXOS.....		181

AC	Adenilato Ciclasa
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADP	Adenosina difosfato
Akt/PKB	Proteína quinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina bovina de suero
BTF3	Factor de transcripción básico 3
ChoRE	Elemento de respuesta a carbohidratos
ChREBP	Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos
CPT1 y 2	Carnitina palmitoil transferasa 1 y 2
CRE	Elementos de respuesta a AMPc
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
CRTC2/TORC2	Coactivador 2 de la transcripción regulada por CREB
DAPI	4.6-diaminidina-2-fenilindol
DPP-4	Dipeptidil peptidasa 4
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eEF1	Factor eucariota de elongación traduccional
Epac1/2	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina activado por AMPc
Ex4	Exendina-4

Abreviaturas

FAS	Ácido graso sintasa
FOXO1	Del inglés “Forkhead O box 1”
G6Pasa	Glucosa 6-fosfatasa
GCK	Glucoquinasa
GCKR	Proteína reguladora de la glucoquinasa
GEFs	Factores que intercambian nucleótidos de guanina
GIP	Péptido inhibitorio gastrointestinal
GKAs	Fármacos activadores de la glucoquinasa
Glc6P	Glucosa 6-fosfato
CHT	Colesterol total
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GLP1-R	Receptor de GLP-1
GLUT 2	Transportador de glucosa 2
GR	Receptor de glucocorticoides
GREs	Elementos de respuesta a glucocorticoides
GRPP	Polipéptido pancreático relacionado con glicentina
GS	Glucógeno sintasa
GSK3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 β
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFD	Dieta alta en grasa
HK	Hexoquinasa
HNF4α	Factor nuclear de hepatocitos 4 α
IP-1/2	Polipéptido intermedio 1/2

IRS	Sustrato del receptor de insulina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LXR	Receptor X hepático
L-PK	Piruvato quinasa hepática
M-CAD	Acil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena media
miARN/miR	MicroARN
MODY	Diabetes monogénica de aparición temprana
mTORC1/2	Del inglés “ <i>Mammalian Target of Rapamycin complex 1/2</i> ”
NAFLD	Esteatosis hepática no alcohólica
P70S6K	Quinasa de la proteína ribosomal S6, subunidad de 70 kDa
PAS	Per-Arnt-Sim
PASK	Proteína quinasa con dominios PAS
<i>Pask</i>^{-/-}	Ratones C57BL/6J deficientes en PASK
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Convertasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDPK1	Proteína quinasa dependiente de fosfoinositidos 1
PDX1	Del inglés “ <i>pancreatic and duodenal homeobox 1</i> ”
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK-1	Fosfofructoquinasa 1
PFK-2/FBPasa-2	Fosfofructoquinasa 2/fructosa bisfosfatasa 2
PGC1α	Coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas y

Abreviaturas

PI3K	Fosfatidilinositol 4,5- bisfosfato 3-quinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PPARs	Receptores activados por los proliferadores peroxisomales
PTEN	Del inglés <i>“Phosphatase and tensin homolog”</i>
RIPA	Del inglés <i>“Radioimmunoprecipitation assay buffer”</i>
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
SCD1	Estearoil-CoA desaturasa
SFD	Dieta estándar
SIRT1	Sirtuina 1
SNC	Sistema Nervioso Central
SREBP	Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides
TBS	Tris-buffer salino
TG	Triglicéridos
TTG	Test de tolerancia a glucosa
TTI	Test de tolerancia a insulina
UGP-1	UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransfera
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WT	Tipo Silvestre

INTRODUCCIÓN

El hígado es un órgano vital para el mantenimiento de la homeostasis de glucosa y lípidos durante los periodos de ayuno/alimentación. La adaptación a esta situación está sujeta a las respuestas hormonales de insulina y glucagón. Estos cambios conducen a la estimulación de genes metabólicos que a su vez son regulados por factores de transcripción y coactivadores.

Durante el ayuno, tiene lugar la gluconeogenesis en la cual intervienen las enzimas Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y Glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) y cuya regulación está controlada por el Coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PGC1 α) y el “Forkhead O box 1” (FOXO1), que forman un complejo que es desactivado mediante fosforilación por Akt/PKB (Proteína quinasa B). A su vez, también tiene lugar la β -oxidación de ácidos grasos, que depende del transporte por la Carnitina palmitoil transferasa (CPT) y las Acil-CoA deshidrogenasas (CAD) que son reguladas por el receptor activado por los proliferadores peroxisomales α (PPAR α).

En situación postprandial, ocurren las rutas de la glucolisis, donde participan la Glucoquinasa (GCK), la Fosfofructoquinasa 1 (PFK-1) y la Piruvato quinasa hepática (L-PK), y la síntesis de ácidos grasos llevada a cabo por las enzimas Acetil-CoA carboxilasa (ACC), la Ácido graso sintasa (FAS) y la Esteroil-CoA desaturasa (SCD). Las enzimas del metabolismo lipídico son reguladas por el receptor X hepático (LXR), la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP1) y la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP). Estos procesos son activados por la acción de la insulina, en cuya señalización es clave la enzima Akt.

Resumen

La GCK es el principal sensor de glucosa hepática. Su actividad está regulada por insulina y por su proteína reguladora (GCKR) y por compartimentación celular según el estado metabólico de la célula. A su vez, desempeña un papel en la homeostasis de glucosa y de lípidos.

La proteína quinasa con dominios PAS (PASK) actúa como regulador energético ya que está implicada en la secreción de insulina y glucagón, además de ser esencial para la expresión de ciertos genes del metabolismo. Se ha descrito que los ratones *Pask*^{-/-} son resistentes a la obesidad inducida por dieta alta en grasa (HFD) y que la deficiencia de PASK altera la respuesta de los sensores metabólicos de glucosa y nutrientes: AMPK (proteína quinasa dependiente de AMP) y mTOR/S6K ("*Mammalian Target of Rapamycin*"/proteína quinasa ribosomal S6).

Los microARNs (miARNs) están implicados en la regulación postranscripcional de numerosos genes y por lo tanto en la homeostasis metabólica y en multitud de enfermedades.

Se han desarrollado fármacos basados en análogos del GLP-1, tales como Exendina-4 (Ex4), que regulan el apetito y la secreción de insulina y glucagón con la finalidad de paliar enfermedades como la diabetes, obesidad y asociadas que están alcanzando números de pandemia.

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis fue analizar el papel de PASK y otros sensores metabólicos en la adaptación del hígado a la regulación por ayuno y alimentación, estudiando el efecto de la carencia de PASK sobre estos procesos y el efecto regulador de la Ex4, junto con el efecto

de PASK en la adaptación a cambios nutricionales y el análisis de las alteraciones metabólicas causadas por la dieta rica en grasas en el desarrollo de obesidad.

RESULTADOS

La expresión de *Pask* fue regulada por condiciones metabólicas, bloqueándose en condiciones de ayuno. Los ratones *Pask*^{-/-} tenían alterada la señalización de insulina en el hígado (sobreactivación de Akt). Además, esta deficiencia condujo a la modificación de la expresión de varios factores de transcripción en su regulación por ayuno y alimentación. Ya que, en ayuno, la expresión de *Foxo1* disminuyó, mientras que la de *Pparγ* y *Ppara* aumentó. Sin embargo, los niveles de PEPCK fueron más altos en ratones *Pask*^{-/-}, pero el transporte de ácidos grasos a la mitocondria estaba bloqueado en estos ratones. Por otro lado, *Lxra* y *Chrebp* estaban sobreexpresados en ratones *Pask*^{-/-} después de la realimentación, pero la expresión de *Acc* y *Fas* disminuyó. Asimismo, estos ratones presentaron una disminución de la expresión del gen *Gck* y de la actividad glucoquinasa y un incremento de la localización nuclear de la GCK.

Por otro lado, la expresión de *Pask* se encontraba bloqueada por Ex4 en todas las condiciones analizadas. La Ex4 también bloqueó la expresión de la mayor parte de los genes activados por ayuno y alimentación. Asimismo, los ratones *Pask*^{-/-} presentaron un aumento de la proteína GCK en presencia de Ex4, sin embargo, no se vio efecto sobre la actividad. Además, estos ratones mantuvieron la sobreactivación de Akt en presencia de Ex4.

Los ratones deficientes en PASK alimentados con HFD mejoraron los siguientes parámetros: peso corporal, tolerancia a glucosa, resistencia a insulina y parámetros lipídicos. La HFD alteró la expresión de *Pask*, impidiendo el bloqueo producido por el ayuno. Además, la deficiencia de PASK bloqueó o disminuyó la expresión de muchos genes

Resumen

sobreexpresados por HFD, tales como factores de transcripción involucrados en la regulación de enzimas gluconeogénicas, el transporte de ácidos grasos a la mitocondria, la β -oxidación y la lipogénesis *de novo*. PASK también reguló la expresión postranscripcional de varios genes a través de miARNs involucrados en el metabolismo de glucosa y lípidos, ya que la deficiencia de PASK cambió el efecto de la HFD en la expresión de miR-143 y miR-33a.

CONCLUSIONES

La deficiencia de PASK disminuye funciones críticas en el hígado. Regula genes y proteínas claves en la señalización de glucosa, como la GCK, y altera la señalización de insulina, afectando a la respuesta a los cambios nutricionales que regulan el metabolismo de glucosa y lípidos. Sin embargo, los ratones *Pask*^{-/-} están protegidos de las alteraciones producidas por HFD, mejorando los niveles de glucosa, la resistencia a la insulina y la adaptación a ayuno y alimentación controlando la expresión de coactivadores, factores de transcripción y miARNs que regulan las enzimas claves de las principales rutas del metabolismo hepático. El análogo de GLP-1, Ex4, controla la expresión de PASK y la adaptación hepática a estados de ayuno/alimentación.

SUMMARY

INTRODUCTION

The liver is a vital organ for maintaining glucose and lipid homeostasis in response to fasting and refeeding periods. The adaptation to this situation depends on the hormonal response of insulin and glucagon. These changes stimulate metabolic genes which are regulated by transcription factors and coactivators.

During fasting, gluconeogenesis occurs and it is done by Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and Glucose 6-phosphatase (G6Pase) and whose regulation is controlled by Transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC1 α) and Forkhead O box 1 (FOXO1), both form a complex that is deactivated by phosphorylation by Akt/PKB (Protein kinase B). Likewise, β -oxidation of fatty acids also occurs and it depends on the transport by Carnitine Palmitoyltransferase 1 (CPT1) and Acyl-CoA Dehydrogenase (CAD), which are regulated by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α).

During postprandial periods, glycolysis occurs, involving Glucokinase (GCK), Phosphofructokinase-1 (PFK-1) and Hepatic pyruvate kinase (L-PK), and fatty acid synthesis also carried out by Acetyl CoA carboxylase (ACC), Fatty acid synthase (FAS) and Stearoyl-CoA desaturase (SCD). Enzymes of lipid metabolism are regulated by Liver X receptor (LXR), Sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) and Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP). These processes are activated by insulin, whose signalling is mediated by the key Akt enzyme.

GCK is the main hepatic glucose sensor. Its activity is regulated by insulin, the Glucokinase regulatory protein (GCKR) and the subcellular location that depends on the metabolic conditions of the cell. In turn, it has a function in glucose and lipid homeostasis.

Summary

PAS domain protein kinase (PASK) is an energy regulator that is involved in the secretion of insulin and glucagon, moreover it is key in the expression of metabolic genes. *Pask*^{-/-} mice are protected against obesity induced by high-fat diet (HFD) and PASK deficiency record an altered response of metabolic glucose and nutrient sensor: AMPK (AMP-activated protein kinase) and mTOR/S6K (*"Mammalian Target of Rapamycin"*/ribosomal S6 kinase) pathways.

miRNAs (microRNAs) are involved in posttranscriptional regulation of a great number of genes and, therefore, in metabolic homeostasis and many diseases.

Drugs based on GLP-1 analogues, such as Exendin-4 (Ex4), that regulate intake and insulin and glucagon secretion, have been developed in order to alleviate diseases such as diabetes, obesity and associated diseases that have reached pandemic proportions.

AIMS

The aim of this thesis was to analyze the function of PASK and other metabolic sensors in the liver adaptation to regulation by fasted and refeeding, evaluating the effect of PASK deficiency on these process and the regulatory effect of Ex4. Furthermore, the effect of PASK in the adaptation to nutritional changes and the analysis of metabolic disorder induced by a high-fat diet in the obesity development.

RESULTS

The expression of *Pask* was regulated by metabolic conditions, being blocked under fasting. *Pask*^{-/-} mice have impaired insulin signaling in the liver (AKT overactivation). Furthermore, PASK deficiency modified the expression of several transcription factors in the adjustment to fasting and refeeding. Thus, the expression of *Foxo1* decreased under fasting conditions, while *Ppara* and *Ppary* increased. However, PEPCK levels were higher in *Pask*^{-/-}

mice, although the transport of fatty acids to mitochondria was blocked in *Pask*^{-/-} mice. By contrast, *Lxra* and *Chrebp* were overexpressed after refeeding, while the expression of *Acc* and *Fas* decreased in *Pask*^{-/-} mice. Likewise, with a lower expression of *Gck* gene and decreased GCK activity and increased nuclear location of the GCK in *Pask*^{-/-} mice.

Furthermore, the expression of *Pask* was blocked by Ex4 under all conditions. The most of genes activated under fasting and refeeding conditions were also blocked by Ex4. Likewise, Ex4 increased GCK protein levels, although, it had not effect in its activity in *Pask*^{-/-} mice. Besides, Ex4 did not change Akt overactivation in *Pask*^{-/-} mice.

PASK-deficient mice with a HFD improved parameters for the following: body weight, glucose tolerance, insulin resistance and lipid parameters. A HFD altered the downregulation of *Pask* expression produced by fasting. Furthermore, PASK deficiency blocked or diminished the expression of many genes overexpressed by HFD, such as the following: transcription factors involved in the regulation of gluconeogenic enzymes, the transport of fatty acid into mitochondria, β -oxidation and de novo lipogenesis. PASK also regulated gene expression post-transcriptionally through the short non-coding RNAs involved in lipid metabolism and glucose homeostasis, since, PASK deficiency changed the HFD effect on the expression of miR-33a and miR-143.

CONCLUSIONS

PASK deficiency impairs critical hepatic functions. It regulates genes and proteins responsible for glucose sensing, such as GCK, and impairs insulin signaling, affecting the response to nutritional changes that regulate glucose and lipid metabolism. However, *Pask*^{-/-} mice are protected against the deleterious consequences of a HFD, improving glucose levels, insulin resistance and adaptation to fasting/feeding, through the control of

Summary

the expression of coactivators, transcription factors and miRNAs that regulate key enzymes of the metabolic pathways of liver. The GLP-1 analogue, Ex4, controls the expression of PASK and the hepatic adaptation to fasting and refeeding periods.

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la homeostasis energética es de vital importancia en la fisiología de los mamíferos. De hecho, las principales enfermedades metabólicas se producen por un desequilibrio y una desregulación de la energía celular. Por lo tanto, es de gran importancia mantener una óptima regulación metabólica para el mantenimiento de la homeostasis energética y el hígado es uno de los órganos claves encargado de ello.

1 PAPEL DEL HÍGADO EN LOS DISTINTOS ESTADOS NUTRICIONALES

El hígado funciona como el principal sistema de equilibrio metabólico que controla la homeostasis de micro y macronutrientes, permitiendo a otros tejidos funcionar con normalidad bajo condiciones de estrés fisiológico [1, 2]. Por tanto, alteraciones en el hígado tienen consecuencias importantes en el organismo.

Durante los periodos de ayuno/alimentación, el hígado juega un papel especialmente importante en la homeostasis de glucosa aumentando o disminuyendo su utilización y producción, dependiendo de la dieta y de las necesidades metabólicas del cuerpo [3]. De esta manera, asegura que tejidos dependientes de glucosa tengan un aporte constante durante periodos de privación de nutrientes. En el hepatocito, los niveles intracelulares y extracelulares de glucosa están en equilibrio gracias al transportador de glucosa GLUT2, que transporta glucosa por difusión facilitada según los cambios en los niveles de glucosa en sangre. De hecho es un participante en el sistema sensor de glucosa pancreático y cerebral [4-6], ya que la ausencia de GLUT2 en células β -pancreáticas impide la secreción de insulina estimulada por glucosa.

AYUNO	ALIMENTACIÓN
<ul style="list-style-type: none">• Estimulación de la Glucogenolisis (ayuno corto)• Aumenta la Gluconeogénesis (ayuno prolongado)• Aumenta la oxidación ácidos grasos.	<ul style="list-style-type: none">• Aumenta la captación de glucosa• Almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno (estimulado por insulina)• Aumenta la Glucolisis• Aumenta la lipogénesis <i>de novo</i>: síntesis de ácidos grasos

Tabla 1. Adaptación del metabolismo hepático ante situaciones de ayuno/alimentación. En la tabla se resumen los principales procesos metabólicos hepáticos que tiene lugar durante el ayuno o la alimentación.

El hígado también tiene gran importancia en la homeostasis lipídica. Así, en estados de ayuno, la oxidación hepática de ácidos grasos aporta energía para la producción de glucosa [3] y, en estados postprandiales, el exceso de hidratos de carbono se convierte en grasas. Además, el colesterol es sintetizado y convertido en ácidos biliares en el hígado según las necesidades de otros tejidos [7].

La adaptación del metabolismo hepático a situaciones de ayuno/alimentación se resume en la **Tabla 1**. Esta adaptación está sujeta a respuestas hormonales (principalmente de origen pancreático) que actúan en función de los estados de ayuno/alimentación, manteniendo los niveles de glucosa en plasma en un rango entre 4 y 7 mM [8].

Durante el ayuno, las células α pancreáticas secretan glucagón como consecuencia de la disminución de glucosa en sangre. En el hígado, el glucagón y los glucocorticoides estimulan la glucogenolisis que tiene lugar entre las 2 y las 6 horas después de la ingesta, pero el efecto a largo plazo es la estimulación de la gluconeogénesis hepática, la principal vía para el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre en ayunos prolongados [3, 9]. Por el contrario, durante periodos postprandiales, la insulina es secretada por células β pancreáticas en respuesta al aumento de glucosa en plasma. En el hígado, esta hormona inhibe la glucogenolisis, la gluconeogénesis y la degradación de lípidos y estimula la glucólisis, la síntesis de glucógeno y la lipogénesis *de novo* (**Figura 1**). El exceso de glucosa

puede almacenarse como glucógeno también en el músculo y los ácidos grasos que provienen de la lipogénesis *de novo* hepática como triglicéridos en el tejido adiposo [8].

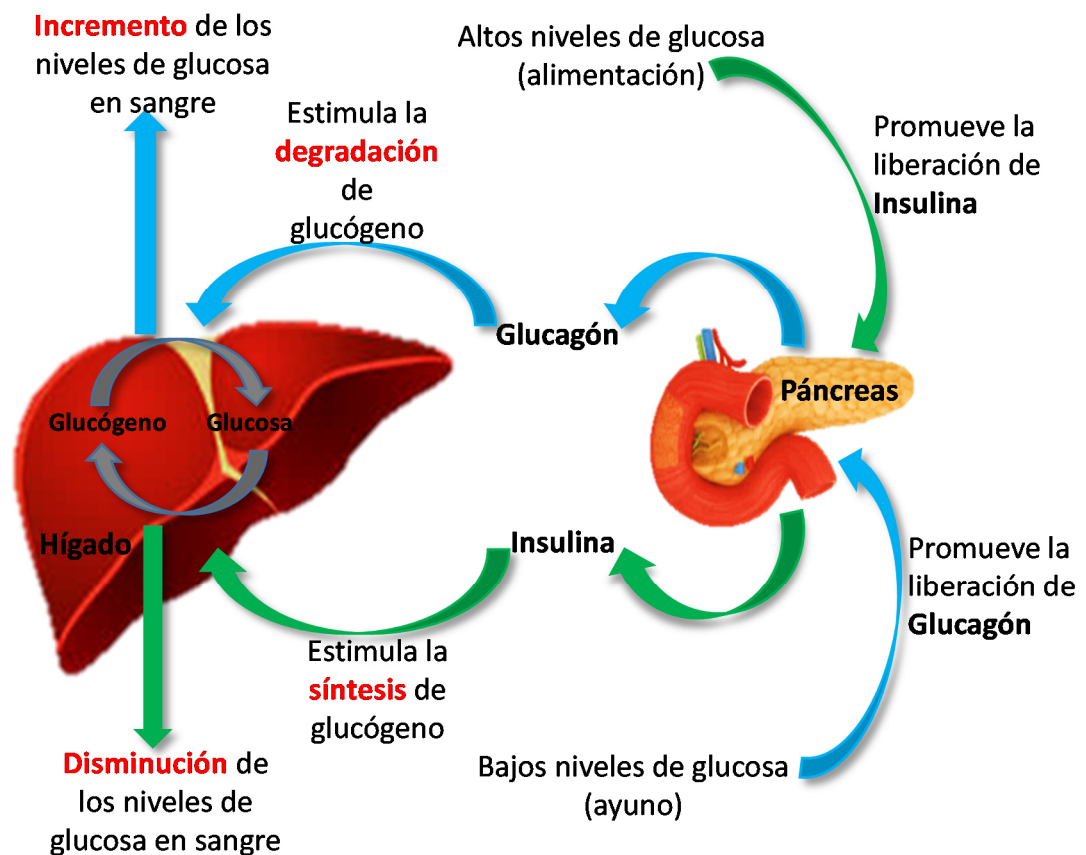


Figura 1. Regulación del metabolismo hepático y mantenimiento de la homeostasis de glucosa por insulina y glucagón. Altos niveles de glucosa promueven la liberación de insulina, la cual estimula la transformación de glucosa en glucógeno en el hígado. Por el contrario, la liberación de glucagón es provocada por la disminución de glucosa en sangre estimulando la degradación de glucógeno a glucosa.

Los cambios nutricionales y hormonales conducen a la estimulación de genes metabólicos, regulados por factores de transcripción y coactivadores claves para mantener la homeostasis de glucosa y lípidos (**Tabla 2**) [7, 10-13].

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	FUNCIÓN EN EL METABOLISMO LIPÍDICO	FUNCIÓN EN EL METABOLISMO GLUCÚDICO
PGC1α	Aumenta la expresión de enzimas de la oxidación de ácidos grasos	Regula la expresión de las enzimas de la gluconeogénesis: PEPCK y G6Pasa
FOXO1		Regula la expresión de las enzimas de la gluconeogénesis: PEPCK y G6Pasa Controla el ratio G6Pasa/GCK: induciendo G6Pasa e inhibiendo GCK
HNF4α	Regula genes del metabolismo de ácidos grasos y colesterol	Regula la expresión de las enzimas de la gluconeogénesis: PEPCK y G6Pasa Estimula la expresión de la GCK
CREB		Regula la expresión de las enzimas de la gluconeogénesis: PEPCK y G6Pasa
GR		Regula la expresión de las enzimas de la gluconeogénesis: PEPCK y G6Pasa
PPARα	Regula la expresión de CPT1, enzima de la β -oxidación de ácidos grasos	Regula la expresión de: PEPCK, GSK3 β y GS
PPARγ	Regula la expresión de enzimas de la lipogénesis: ACC, FAS y SCD1	Regula la expresión de GLUT4
SREBP1c	Regula la expresión de enzimas de la lipogénesis: ACC, FAS y SCD1	Inhibe la formación del complejo HNF4 α /PGC1 α necesario en la gluconeogénesis Regula la acción de la insulina sobre la GCK
LXR	Regula la expresión de SREBP1c y de las enzimas lipogénicas SCD1 y FAS	Regula la expresión de: IRS y GLUT-4
ChREBP	Regula la expresión de las enzimas lipogénicas: FAS y ACC	Regula la expresión de L-PK, enzima de la glucólisis

Tabla 2. Factores de transcripción reguladores de la homeostasis de lípidos y glucosa. En la tabla se muestran los principales factores de transcripción estudiados en esta tesis y las enzimas que regulan en el metabolismo lipídico y glucídico. **PGC1 α** (Coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ); **FOXO1** ("Forkhead O box 1"); **HNF4 α** (Factor nuclear de hepatocitos 4 α); **CREB** (Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc); **GR** (Receptor de glucocorticoides); **PPARs** (Receptores activados por los proliferadores peroxisomales); **SREBP1c** (Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides); **LXR** (Receptor x hepático); **ChREBP** (Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos); **PEPCK** (Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa); **G6Pasa** (Glucosa 6-fosfatasa); **GCK** (Glucoquinasa); **CPT1** (Carnitina palmitoil transferasa 1); **SCD1** (Estearoil-CoA desaturasa); **FAS** (Ácido graso sintasa); **ACC** (Acetil-CoA carboxilasa); **L-PK** (Piruvato quinasa hepática); **GSK3 β** (Glucógeno sintasa quinasa 3 β); **GS** (Glucógeno sintasa).

Además de los factores de transcripción enunciados en la **Tabla 2**, otro regulador clave en el metabolismo de glúcidos y lípidos es la sirtuina 1 (SIRT1). Las sirtuinas son una familia de proteínas desacetilasas constituidas por 7 miembros [14], localizadas en distintos compartimentos celulares [15]. Estas proteínas están implicadas en el control del estrés oxidativo, metabolismo, regulación celular y apoptosis. Durante el ayuno, la SIRT1 desacetila factores de transcripción modificando su actividad, como el Coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PGC1 α) o el “Forkhead O box 1” (FOXO1) en el caso del metabolismo glucídico o el receptor activado por los proliferadores peroxisomales α (PPAR α) en el de lípidos [16].

1.1 Rutas metabólicas hepáticas activadas en respuesta al ayuno

Aunque las proteínas y las grasas pueden ser movilizadas desde el músculo y el tejido adiposo, respectivamente, para aportar energía a otros tejidos durante ayunos prolongados, las células sanguíneas y el cerebro necesitan glucosa como principal fuente de energía.

Por tanto, en estados de ayuno, la producción de glucosa y la oxidación de ácidos grasos son esenciales para mantener el balance energético (**Figura 2**).

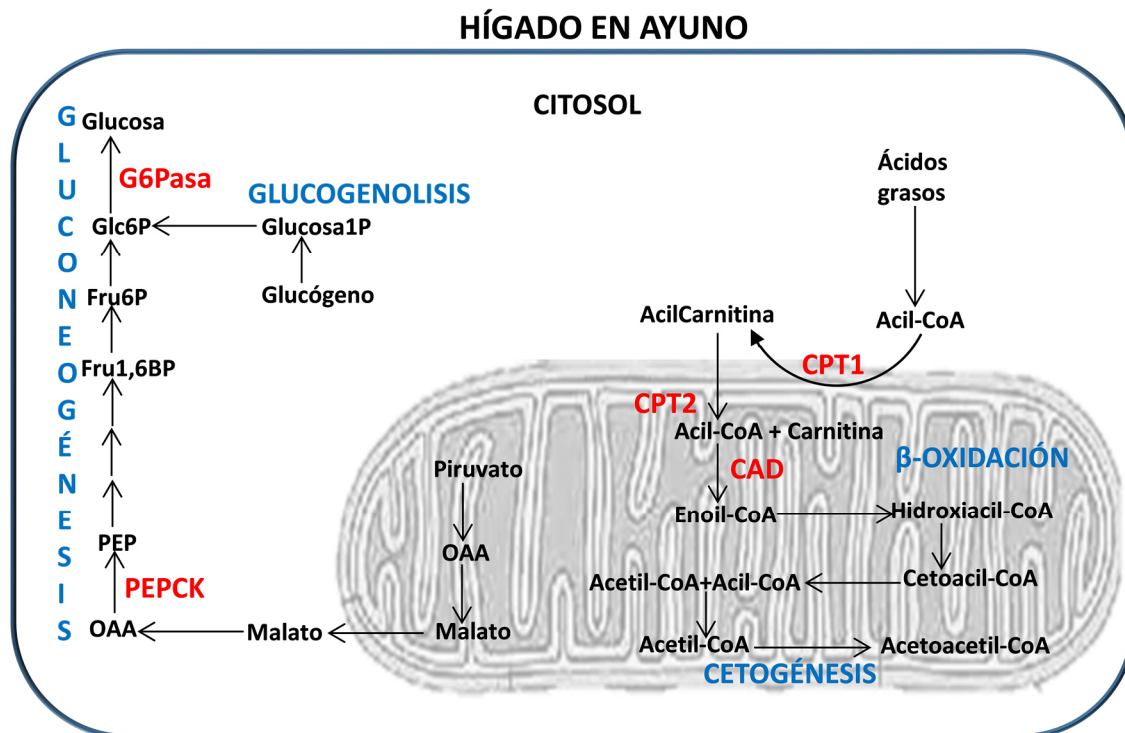


Figura 2. Esquema de las rutas metabólicas hepáticas activadas en ayuno. Durante el periodo de ayuno en el hígado tienen lugar diferentes rutas metabólicas para mantener el balance energético. 1) Durante las primeras horas del ayuno tiene lugar la glucogenólisis para transformar el glucógeno almacenado en glucosa. 2) Los precursores de la glucosa (Lactato, Aminoácidos, Glicerol) se convierten en Piruvato o en otros intermediarios de la vía y en la mitocondria el Piruvato se transforma en malato que puede ser transportado al citosol para originar de nuevo Oxalacetato (OAA). Este es usado por la Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) como sustrato para la gluconeogénesis, cuya finalidad es la obtención de glucosa. El último paso de esta ruta está catalizado por la Glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa). Los ácidos grasos se pueden utilizar como combustible mediante la β -oxidación, después de su activación y transporte, donde intervienen las enzimas Carnitina palmitoil transferasas 1 y 2 (CPT1 y 2), se metabolizan secuencialmente a Acetil-CoA. Una Acil-CoA deshidrogenasa (CAD) cataliza la primera reacción de cada ciclo. Cuando la gluconeogénesis está activa, el Acetil-CoA no entra en el ciclo del ácido cítrico y se utiliza para la síntesis de cuerpos cetónicos (Cetogénesis).

1.1.1 Metabolismo glucídico

La gluconeogénesis es la ruta metabólica responsable de la formación de glucosa desde precursores que no son carbohidratos y es clave para mantener la glucemia, por ejemplo durante el ejercicio o el ayuno prolongado. Dos enzimas fundamentales en la gluconeogénesis son: la Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la Glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) [12] (**Figura 2**).

La PEPCK cataliza la conversión de Oxalacetato (OAA) a Fosfoenolpiruvato (PEP). Tiene 2 isoformas, una citosólica y otra mitocondrial [17], y cada una de ellas lleva a cabo la gluconeogénesis a partir de diferentes sustratos (**Figura 2**). Mientras que la PEPCK mitocondrial usa lactato, la citosólica utiliza como precursores aminoácidos glucogénicos. Los niveles de PEPCK son regulados por los cambios de hormonas e intermediarios celulares inducidos por los estados nutricionales. En el hígado, su síntesis es inducida por el ayuno e inhibida por una dieta rica en carbohidratos. A nivel hormonal, su síntesis está favorecida por el glucagón (a través de la vía del AMPc), por glucocorticoides y por hormonas tiroideas, mientras que está inhibida por insulina [17]. Asimismo, cuando la glucosa es elevada, se induce la acetilación de esta enzima promoviendo su degradación en el proteosoma.

La G6Pasa cataliza la etapa final de la ruta de la gluconeogénesis, en la que se produce la hidrólisis de glucosa 6P en glucosa y un grupo fosfato, paso que es compartido entre 2 rutas metabólicas: la gluconeogénesis y la glucogenolisis (**Figura 2**). Su expresión está regulada a nivel transcripcional ya que su promotor contiene sitios de unión a factores de transcripción que responden a hormonas como la insulina y el glucagón [12]. Además, el ratio Glucoquinasa (GCK)/G6Pasa es muy importante en el destino metabólico de la glucosa en el hígado. Así, la sobreexpresión de G6Pasa puede conducir a diabetes [18], debido a la reducción en la síntesis de glucógeno y el aumento en la producción de glucosa desde lactato.

La regulación a nivel transcripcional de las enzimas claves de la gluconeogénesis es compleja y la realizan factores de transcripción y coactivadores, algunos de los cuales se resumen en la **Tabla 2**.

Introducción

El coactivador PGC1 α juega un papel importante en la biogénesis mitocondrial, la β -oxidación y la termogénesis, pero también está involucrado en la regulación de la homeostasis de glucosa [19]. Durante el ayuno, se produce un aumento del glucagón y de los glucocorticoides que regulan de forma positiva al PGC1 α y este ejerce su función reguladora mediante interacción con diferentes factores de transcripción y receptores nucleares (FOXO1, HNF4 α (Factor nuclear de hepatocitos 4 α), GR (Receptor de glucocorticoides)), ya que su interacción facilita la actividad de las histonas acetiltransferasas y el ensamblaje de la maquinaria transcripcional en los genes diana. PGC1 α está regulado por acetilación/desacetilación. La desacetilación y activación es llevada a cabo por SIRT1, que a su vez también aumenta durante el ayuno [20, 21]. La interacción de PGC1 α con FOXO1, HNF4 α y GR es necesaria para la activación de las enzimas gluconeogénicas durante el ayuno [13, 21] (**Figura 3**).

Los factores de transcripción de la familia FOXO reconocen elementos de respuesta a insulina (IRE) en los promotores de genes diana. Estas proteínas pueden sufrir modificaciones postraduccionales reversibles como acetilación y fosforilación. En periodos de alimentación, cuando los niveles de insulina están altos, la acetilación de FOXO1 disminuye su afinidad por los promotores de sus genes dianas y aumenta su sensibilidad a ser fosforilado por Akt/PKB (Proteína quinasa B) quedando retenido en el citoplasma [22-24]. Por el contrario, durante el ayuno disminuye esta fosforilación y es desacetilado por SIRT1, lo que provoca su retención en el núcleo y tras su interacción con PGC1 α , promueve la activación transcripcional de las enzimas PEPCK y G6Pasa [12, 25-28] (**Figura 3**).

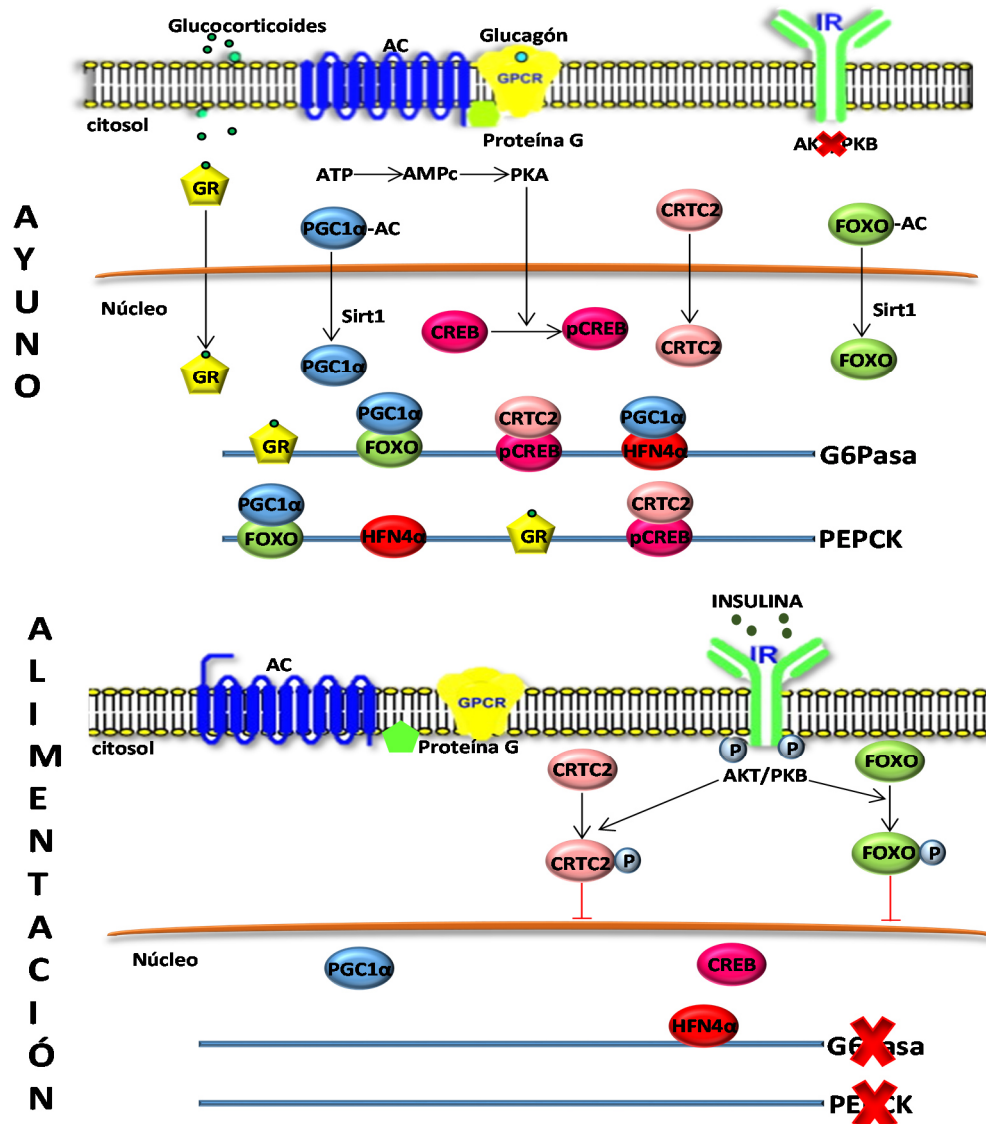


Figura 3. Regulación transcripcional de la gluconeogénesis. Durante el ayuno, los niveles de insulina decrecen, disminuyendo la unión a su receptor y, por lo tanto, la activación de la vía de señalización PI3K/Akt (Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa/proteína quinasa B). Además, se libera glucagón que se une a su receptor (GPCR) (receptor acoplado a proteína G). Estimula la unión de la proteína G y aumenta los niveles de AMPc (Adenosín monofosfato cíclico) permitiendo la activación de PKA (Proteína quinasa A). Dicha proteína fosforila a CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc) en el núcleo, el cual forma un complejo con CRTC2 (Coactivador 2 de la transcripción regulada por CREB). En estas condiciones, los glucocorticoides atraviesan la membrana plasmática para unirse a su receptor en el citosol y el complejo formado entra al núcleo. Por otro lado, PGC1 α (Coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ) y FOXO1 ("Forkhead O box 1") son desacetilados por SIRT1 (Sirtuina 1) en el citosol permitiendo su entrada al núcleo donde forman un complejo. Todos estos factores de transcripción, junto con el HFN4 α (factor nuclear de hepatocitos 4 α), se unen al promotor de la PEPCK (Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y G6Pasa (Glucosa 6-fosfatasa) para que tenga lugar su expresión y la gluconeogénesis. Por el contrario, durante los periodos de alimentación, se inhibe la liberación de glucagón y la unión de la proteína G a su receptor, pero se induce la liberación de la insulina, que se une a su receptor (IR) y activa la vía de señalización PI3K/Akt. Akt fosforila a FOXO y CRTC2 impidiendo su entrada al núcleo para formar complejos. Además, no se generan glucocorticoides y la PKA no puede fosforilar a CREB. Todo esto impide que los factores de transcripción se puedan unir a los promotores de las enzimas, inhibiéndose la gluconeogénesis. Adaptado de [12].

Introducción

La activación transcripcional de las enzimas PEPCK y G6Pasa requiere además de otros factores de transcripción (**Tabla 2**). La proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) tras la interacción con el coactivador 2 de la transcripción regulada por CREB (CRTC2/TORC2) permite el reconocimiento de elementos de respuesta a AMPc (CRE) [12] (**Figura 3**). Los glucocorticoides estimulan la gluconeogénesis hepática a través de la unión a su receptor (GR) [12]. Estos receptores y HFN4 α forman ambos complejos con el PGC1 α (PGC1 α -GR, PGC1 α -HFN4 α) que interactúan con los promotores de genes dianas (**Figura 3**).

1.1.2 Metabolismo lipídico

La oxidación de ácidos grasos es un proceso importante del metabolismo lipídico en respuesta a ayuno. Proporciona el 80% de energía hepática e impulsa la síntesis de cuerpos cetónicos que son utilizados por tejidos extrahepáticos [29].

El ayuno induce la expresión de enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos, resumidas en la **Figura 2**.

Antes de comenzar la β -oxidación, es necesaria la entrada de ácidos grasos de cadena larga desde el citoplasma a la matriz mitocondrial donde tiene lugar este proceso, y esta acción es llevada a cabo por la Carnitina palmitoil transferasa (CPT).

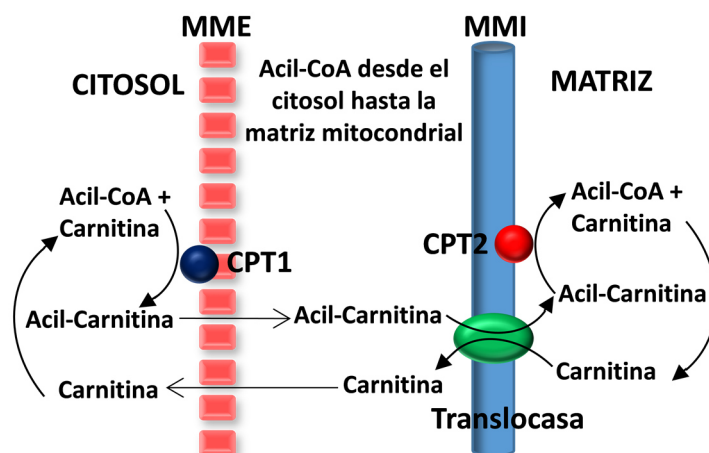


Figura 4. Acción de la Carnitina Palmitoil Transferasa en el transporte de ácidos grasos hacia la matriz mitocondrial. Se ilustra el mecanismo de acción de las 2 isoenzimas de la Carnitina palmitoil transferasa (CPT). En la membrana mitocondrial externa (MME), la CPT1 transfiere la porción acilo del Acil-CoA (forma activa del ácido graso) a la Carnitina generando Acil-carnitina, la cual es translocada a la membrana mitocondrial interna (MMI). Allí, la CPT2 genera de nuevo Acil-CoA que es utilizado para la β -oxidación.

La CPT1, en la membrana mitocondrial externa (MME), transfiere el grupo Acilo desde un Acil-CoA a la Carnitina formando Acil-carnitinas. Estos compuestos pasan a la membrana mitocondrial interna (MMI) a través de una translocasa. Ya en la matriz, la CPT2 pasa la porción acilo de nuevo al CoA para que comience la β -oxidación [30] (**Figura 4**). La CPT1 es inhibida por Malonil-CoA, intermediario de la síntesis de ácidos grasos [31].

Los ácidos grasos en la matriz mitocondrial pueden ser oxidados secuencialmente a Acetil-CoA. La primera etapa es catalizada por una Acil-CoA deshidrogenasa (CAD), que para el caso de los de cadena media (C_6 - C_{10}) es la M-CAD [29] (**Figura 2**).

En la regulación transcripcional de las enzimas claves del metabolismo de ácidos grasos están implicados los PPARs (**Tabla 2**). Hay 3 isoformas: α , β y γ . Mientras que PPAR α está más implicado en el catabolismo de ácidos grasos, el PPAR γ tiene una mayor influencia en su almacenamiento [32]. Ambos requieren como coactivador al PGC1 α [33].

PPAR α aumenta durante el ayuno, estimulando el transporte y la β -oxidación de ácidos grasos y la producción de cuerpos cetónicos. Tiene multitud de dianas relacionadas

Introducción

con el metabolismo de ácidos grasos. Entre ellas destacan proteínas transportadoras y translocasas de ácidos grasos y enzimas que facilitan su entrada en la mitocondria para su oxidación, como la CPT [34].

En condiciones de ayuno, la SIRT1 desacetila y activa PGC1 α . Así, en el hígado, la SIRT1 provoca una disminución de ácidos grasos libres y de los niveles de colesterol. Su importancia en la homeostasis lipídica se pone de manifiesto en los ratones carentes de SIRT1, que presentan una reducción en la expresión de las enzimas implicadas en la β -oxidación, mientras que al contrario tienen niveles elevados de enzimas lipogénicas implicadas en la síntesis de ácidos grasos, como la Ácido graso sintasa (FAS) [35].

La regulación del metabolismo hepático y de la producción de glucosa hepática puede tener lugar también de forma indirecta por acción de la insulina en otros órganos como el sistema nervioso central (SNC) [36]. Se ha descrito también que el bloqueo de la CPT en el cerebro inhibe la gluconeogénesis hepática y reduce la expresión de PECK y G6Pasa [37].

1.2 Rutas metabólicas hepáticas activadas en estado postprandial

En periodos postprandiales, cuando se exceden los niveles normales de glucosa en sangre, el hígado controla la glucemia gracias a la captación de glucosa. Después de una comida, la liberación de insulina provoca que el 20-30% de los carbohidratos sean almacenados como glucógeno en el hígado y en el músculo esquelético. Este aumento en los niveles de insulina también provoca la activación de la glucólisis y de la síntesis de ácidos grasos. En estas condiciones la principal función de la glucólisis es suministrar carbonos para la síntesis *de novo* de lípidos [3] (**Tabla 1**).

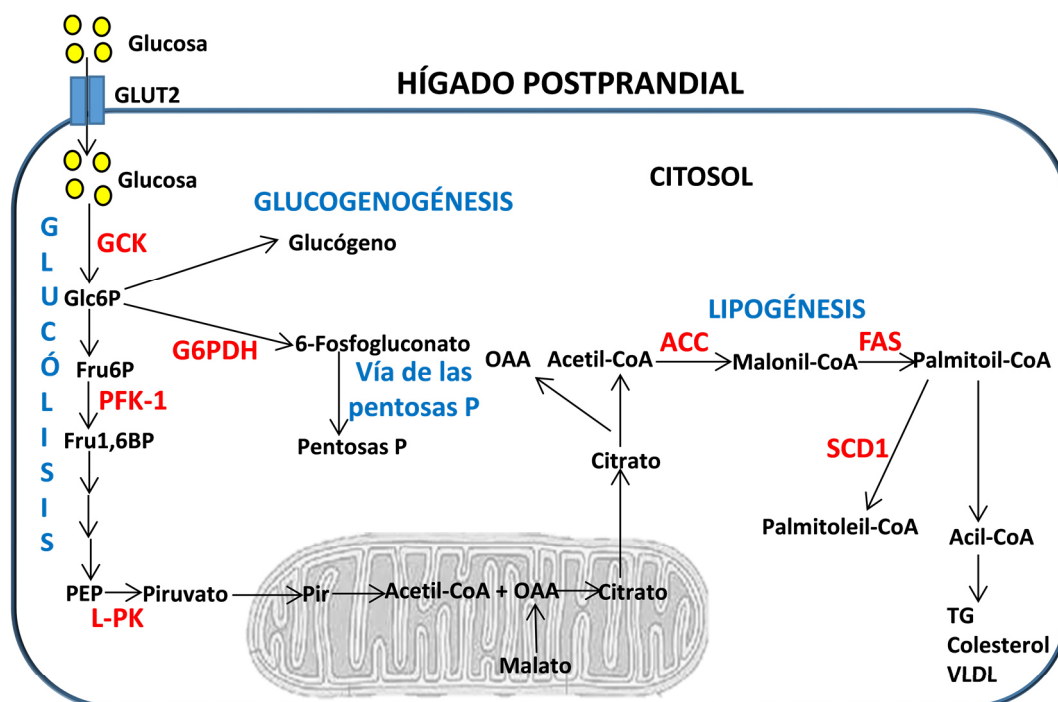


Figura 5. Esquema de las rutas metabólicas hepáticas activas en estado postprandial. La glucosa entra en la célula hepática a través del transportador GLUT2. Una vez dentro, se activa por fosforilación llevada a cabo por la glucoquinasa (GCK) o hexoquinasa (HK) y puede seguir la vía glucolítica para transformarse en Piruvato (Pir), proceso en el que intervienen, además de la GCK, las enzimas Fosfofructoquinasa 1 (PFK-1) y Piruvato quinasa hepática (L-PK). El Piruvato generado entra en la mitocondria para formar Citrato, que también puede salir de nuevo al citosol, y allí origina Acetil-CoA, que es utilizado como sustrato para la lipogénesis. En esta ruta intervienen las enzimas Acetil-CoA carboxilasa (ACC), Ácido graso sintasa (FAS) y Esteroil-CoA desaturasa (SCD1). La síntesis de triglicéridos (TG) consiste en la incorporación de tres moléculas de Acil-CoA a los tres átomos de carbonos del Glicerol 3P. Posteriormente, son transportados en forma de lipoproteínas como las VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad) que los transportan a tejidos extrahepáticos. En estas condiciones, también tienen lugar las rutas de la glucogenogénesis y de las pentosas fosfato a partir de Glucosa 6-fosfato (Glc6P).

1.2.1 Metabolismo glucídico

Durante los periodos de alimentación, la glucólisis es la principal vía de oxidación de glucosa (**Tabla 1**) proporcionando energía y sustratos para otras vías, y presenta un equilibrio con la oxidación de ácidos grasos para cubrir todas las necesidades metabólicas [38].

Las principales enzimas de la glucólisis, que además catalizan reacciones irreversibles, son: la GCK, la Fosfofructoquinasa 1 (PFK-1) y la Piruvato quinasa hepática (L-PK) (**Figura 5**).

Introducción

La regulación de los genes de las enzimas glucolíticas es llevada a cabo por factores de transcripción (**Tabla 2**) sujetos al control hormonal.

La L-PK sin embargo, no es regulada por insulina, sino por glucosa directamente, dado que el promotor de su gen contiene elementos de respuesta a carbohidratos (ChoRE), a los que se une la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP) induciendo la transcripción [38, 39]. ChREBP es regulado de manera recíproca por glucosa y AMPc. En condiciones basales se encuentra en el citosol, pero cuando las concentraciones de glucosa son altas se produce su fosforilación y translocación al núcleo. ChREBP está también implicado en el metabolismo lipídico y en la diabetes tipo 2.

1.2.2 Metabolismo lipídico

La elevación de la insulina después de la ingesta, induce la conversión del exceso de carbohidratos en ácidos grasos en el hígado. Posteriormente, son exportados a otros tejidos para la producción de ATP o bien almacenados cuando se exceden las necesidades metabólicas.

En la lipogénesis *de novo* participan las enzimas Acetil-CoA carboxilasa (ACC), FAS y Esteroil-CoA desaturasa (SCD) catalizando distintos pasos indicados en la **Figura 5**.

Inicialmente, la ACC cataliza la síntesis de Malonil-CoA que actúa como molécula donadora de carbonos para la síntesis de ácidos grasos [40]. Además, regula la entrada de ácidos grasos a la mitocondria para la β -oxidación mediante la inhibición de la CPT1 [41]. Posteriormente, la FAS cataliza 7 reacciones enzimáticas diferentes dirigidas a la síntesis de ácidos grasos a partir de Acetil-CoA y Malonil-CoA. El proceso se repite hasta la formación de palmitato de 16 carbonos [42]. Finalmente, la SCD lleva a cabo la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados. Cabe destacar la importancia de la isoforma 1 (SCD1) en la respuesta

metabólica frente a dietas ricas en carbohidratos donde se induce su expresión [43], mientras que la pérdida de esta proteína produce un menor incremento de peso y disminución de la acumulación de triglicéridos en ratones obesos [44].

Estas enzimas están reguladas a nivel transcripcional en respuesta a señales hormonales y nutricionales (**Tabla 2**).

Uno de los principales reguladores transcripcionales del metabolismo lipídico es el Receptor X hepático (LXR), tras formar un heterodímero con el Receptor X de retinoides (RXR) [45], regula los niveles de colesterol y su absorción intestinal. Además, activa la transcripción de la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP1c) [46], promoviendo de forma indirecta la expresión de las enzimas lipogénicas. Sin embargo, durante el ayuno, el aumento de PPAR α , bloquea la acción de LXR sobre el SREBP1c inhibiendo la formación del heterodímero LXR-RXR [47]. En el caso de la regulación de FAS existe también regulación directa por LXR-RXR [48] (**Figura 6**).

La familia SREBP (3 isoformas) regula la homeostasis lipídica. SREBP1c (predominante en el hígado) controla la expresión de los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, y la homeostasis de glucosa [7]. Se sintetiza como precursor en el retículo endoplásmico, translocándose posteriormente al aparato de Golgi donde sufre una escisión proteolítica liberando la forma madura que migra al núcleo, donde realiza su función. En el núcleo, la insulina impide una rápida degradación de esta forma madura [7].

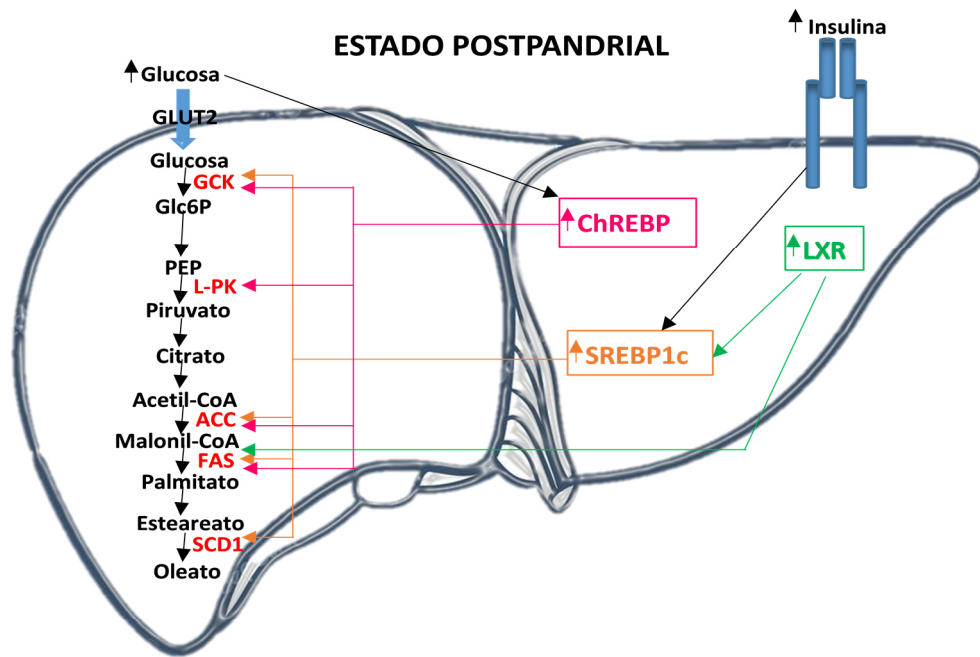


Figura 6. Esquema de la regulación de la lipogénesis *de novo* tras la ingesta. La insulina activa al factor de transcripción SREBP1c (Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides), el cual es el principal estimulador de la lipogénesis. Este factor puede ser inducido de forma directa por LXR (Receptor X hepático). SREBP1c actúa sobre las principales enzimas de la síntesis de ácidos grasos, ACC (Acetil-CoA carboxilasa), FAS (Ácido graso sintasa) y SCD1 (Esteroil-CoA desaturasa). El factor de transcripción LXR también regula de forma directa la enzima FAS. Por otro lado, el factor de transcripción ChREBP (Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos), activado por glucosa, además de actuar sobre la L-PK (Piruvato quinasa hepática) influyendo en el metabolismo glucídico, tiene una acción directa sobre la FAS y la ACC implicadas en el metabolismo lipídico.

Su expresión responde a señales hormonales y a estados nutricionales, aumentando durante la ingesta debido a la insulina y disminuyendo durante el ayuno por el glucagón [7, 49]. Postprandialmente, SREBP1 promueve la expresión de genes lipogénicos (*Fas* o *Acc*) (Figura 6) y suprime la gluconeogénesis porque impide la unión entre HNF4 α /PGC1 α que induce la expresión de las enzimas gluconeogénicas PEPCK y G6Pasa [50].

Además, el SREBP1 es regulado mediante modificaciones postraduccionales. Así, la acetilación de SREBP1 aumenta en estados postprandiales cuando aumenta su actividad, contribuyendo a la lipogénesis hepática. Por el contrario, durante el ayuno SIRT1 desacetila

e inhibe a SREBP1 disminuyendo su estabilidad y la capacidad de unirse a promotores de genes lipogénicos. Por ello, tiene un efecto protector frente ciertas enfermedades metabólicas que impliquen un aumento de la lipogénesis, tales como hígado graso, obesidad y diabetes tipo 2 [51]. Asimismo, se ha descrito que los niveles de SREBP1 están más elevados y su acetilación es mayor en ratones obesos [52], y esto se relaciona con la resistencia hepática a la insulina y con el desarrollo de hígado graso. Es por todo ello, que el SREBP1 debe ser considerado una importante diana terapéutica.

El ChREBP es también importante en el metabolismo de lípidos y de hecho actúa coordinadamente con SREBP1 para regular el metabolismo de glúcidos y lípidos. Actúa sobre la expresión de la FAS y ACC de forma similar a como lo hacía sobre la L-PK porque estas 2 enzimas también presentan ChoRE en sus promotores [39] (**Figura 6**).

PPAR γ está implicado en la diferenciación de adipocitos y en el almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo. Sus genes dianas en este tejido son la *Fas* y la *Acc*, regulando así la lipogénesis [32]. En el hígado se expresa a niveles bajos y está implicado en la regulación de la síntesis de ácidos grasos, pero su sobreexpresión puede dar lugar a adiposis hepática [10]. Por el contrario, la represión de la función de PPAR γ por la SIRT1, aumenta la lipólisis en el tejido adiposo blanco y la secreción de insulina [53].

1.2.3 Ruta de la Insulina

La insulina es el principal regulador de los niveles de glucosa en sangre. Los niveles de esta hormona disminuyen gradualmente durante el ayuno y aumentan al comienzo de la realimentación. La resistencia hepática a la insulina impide su acción en este órgano lo que conduce al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 [54]. La disminución de la sensibilidad a insulina da lugar a hiperglucemia e incremento en la producción de glucosa, aumentando la situación crónica de hiperglucemia e hiperinsulinemia característica de la diabetes [1]. Esta resistencia a la acción de la insulina conlleva la desregulación de la síntesis de lípidos ocasionando esteatosis hepática y mayor resistencia a insulina.

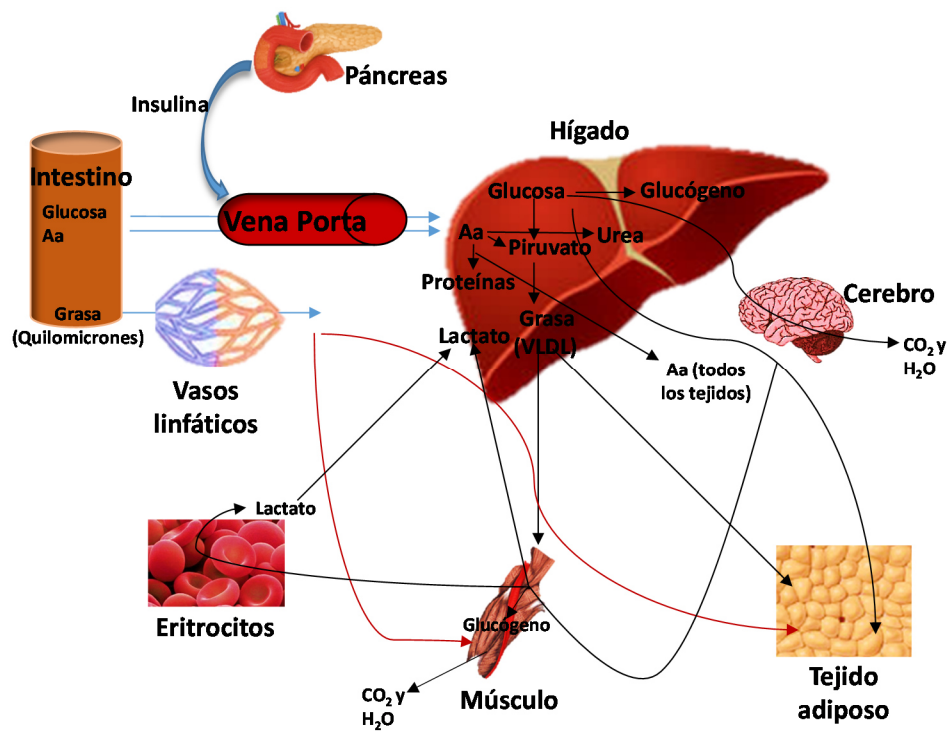


Figura 7. Regulación del metabolismo hepático por insulina y su interrelación con otros tejidos. En condiciones de alimentación, la insulina liberada por el páncreas pasa al hígado a través de la vena porta junto con glucosa y aminoácidos (Aa) provenientes del intestino. En el hígado, la insulina impulsa la síntesis de glucógeno a partir de glucosa o promueve que la glucosa se transforme en Piruvato que puede dar lugar a grasas. Parte de esta glucosa es transportada a cerebro, eritrocitos, tejido adiposo y músculo. Por otro lado, los Aa pueden ser utilizados para la síntesis de proteínas y el resto se reparte por todos los tejidos. La grasa que se genera en el hígado se incorpora en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que también se distribuyen por el tejido adiposo y el músculo junto con la que proviene del intestino (quilomicrones). El músculo utiliza la glucosa proveniente del hígado bien para generar glucógeno o para metabolizarla generando lactato. Parte del lactato producido en músculo y eritrocitos llega al hígado.

La insulina regula el metabolismo, el crecimiento celular y la supervivencia. Estas acciones las inicia a través de una cascada de señalización que regula la actividad de diversas enzimas y factores de transcripción [55].

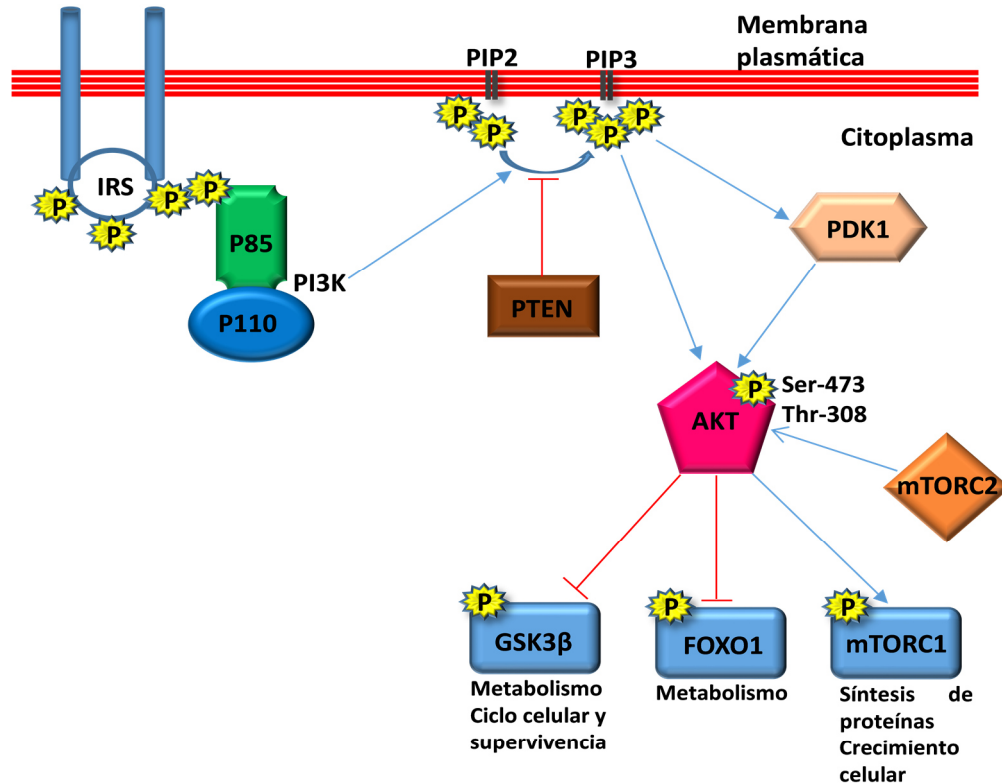


Figura 8. Esquema de la ruta de señalización de la insulina. En periodos de alimentación la insulina se une a su receptor y lo activa. El sustrato del receptor de insulina (IRS) se encarga de transmitir la señal a la Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa (PI3K), que está formada por 2 subunidades (P85 y P110). La PI3K es la encargada de fosforilar y transformar el Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) y este mantiene la Akt (proteína quinasa B) en la membrana para que sea fosforilada por la proteína quinasa dependiente de fosfoinositidos 1 (PDK1) y por mTORC2 ("Mammalian Target of Rapamycin complex 2"). Una vez fosforilada y activa, Akt presenta diferentes dianas como GSK3β (Glucógeno sintasa quinasa 3β) y FOXO1 ("Forkhead O box 1") que son fosforiladas e inhibidas y mTORC1 ("Mammalian Target of Rapamycin complex 1") que es activado por fosforilación. La actividad de la ruta depende a su vez, de la fosfatasa PTEN ("Phosphatase and tensin homolog") que desfosforila los productos de la PI3K.

Tras la activación del receptor de insulina, el sustrato del receptor de insulina (IRS) es el encargado de transmitir la señal hasta efectores intracelulares implicados en la regulación de la homeostasis de glucosa y de lípidos. Una vez activado, el IRS interacciona con la Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa (PI3K) produciendo Fosfatidilinositol 3,4,5-

Introducción

trifosfato (PIP₃). Su presencia mantiene la serina-treonina quinasa Akt/PKB en la membrana plasmática, donde es fosforilada y activada por la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1) y por mTORC2 (*"Mammalian Target of Rapamycin complex 2"*). Una vez activada, la Akt promueve la fosforilación de la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK3β), de FOXO1 y de componentes de la vía mTOR [8] (**Figura 8**).

El IRS presenta 4 isoformas (IRS-1-4). De ellas, IRS1 e IRS2 son mayoritarias en hígado y se encuentran desreguladas en el hígado de diabéticos [56, 57].

La actividad de la ruta es regulada por fosfatasas como la PTEN (*"Phosphatase and tensin homolog"*) [58], que se identificó como un supresor de tumores, pero también es un regulador negativo de la vía. Esta fosfatasa desfosforila los productos de la PI3K produciendo su disminución y menor activación de la Akt. Por el contrario, la pérdida de PTEN aumenta la señalización de esta vía promoviendo la progresión del ciclo celular, la resistencia a apoptosis y la transformación oncogénica [58].

La actividad de la Akt también es regulada por acetilación/desacetilación que regula su interacción con PIP₃ [59]. Cuando la Akt es acetilada se bloquea su unión a PIP₃, impidiendo su localización en la membrana y su activación. Por el contrario, la desacetilación por sirtuinas aumenta la unión a PIP₃ y promueve su activación [60, 61]. La formación de un complejo entre ambas está favorecida por la glucosa y por la inhibición de PI3K y está inhibido por insulina. La Akt puede interaccionar con SIRT1, pero cuando la PI3K está inhibida se incrementa su asociación con SIRT2 [61].

Además del FOXO1, la Akt presenta otras dianas:

- La GSK3 β que es fosforilada e inhibida por la Akt. Esta quinasa se encuentra implicada en respuestas metabólicas pero también en vías de proliferación y antiapoptóticas [58].
- El complejo mTOR es activado por la proteína Akt promoviendo la síntesis de proteínas y el crecimiento celular [62].

La insulina puede suprimir la producción de glucosa, inhibiendo directamente la gluconeogénesis hepática pero también por vía indirecta actuando sobre receptores hipotalámicos cerebrales [63].

2 LA GLUCOQUINASA (GCK)

La glucosa es utilizada por las células como sustrato energético, pero también como una molécula de señalización. En este sentido es de gran importancia funcional los sistemas sensores capaces de detectar los niveles circulantes de glucosa y responder consecuentemente. Entre los componentes de los sistemas sensores de glucosa destacan el transportador de glucosa GLUT2 (que ya se menciona anteriormente) y la enzima GCK.

La GCK es el principal sensor de glucosa y juega un papel central en su homeostasis. La GCK o hexoquinasa (HK) IV cataliza el primer paso del metabolismo de la glucosa, por transferencia de un grupo fosfato desde el ATP generando Glucosa 6-fosfato (Glc6P). Este paso es esencial tanto para su metabolismo como para la regulación de la expresión de genes glucolíticos y lipogénicos [64].

Tiene una masa molecular de 52 kDa. Su papel como sensor de glucosa es posible gracias a sus propiedades cinéticas que la diferencian de otras hexoquinasas [65]:

- Alta K_m (5-15mM), es decir, baja afinidad por glucosa.
- No es inhibida por su producto, la Glc6P.

Introducción

- Presenta una cinética sigmoidea con respecto a glucosa, en lugar de hiperbólica.

Fue descubierta hace 50 años en diferentes tejidos, principalmente en el hígado y en las células β pancreáticas pero también se expresa en la glándula pituitaria, en neuronas y en las células enteroendocrinas K y L localizadas en el intestino [66]. Se le atribuye un doble papel: sensor de glucosa en la producción y liberación de insulina por células β pancreáticas y regulación del metabolismo de la glucosa en el hígado, en respuesta a los cambios de los niveles de glucosa en sangre [67]. La GCK hepática y de las células β pancreáticas está codificada por un mismo gen, pero en cada tejido se utilizan promotores específicos: un promotor “*upstream*” en las células β pancreáticas y uno “*downstream*” promotor en hepatocitos [68, 69]. Ambas isoformas se diferencian en 15 aminoácidos del extremo N-terminal.

Además, la GCK ha sido identificada en cerebro, en concreto en los núcleos hipotalámicos, zonas sensibles a glucosa e implicadas en el control de la ingesta y del metabolismo. El ARNm de la GCK cerebral es idéntico al detectado en las células β pancreáticas [70].

2.1 Regulación de la GCK

La GCK está regulada a nivel transcripcional y postraducciona.

Los promotores de la GCK pancreática y hepática presentan una regulación diferente. En el caso de las células β pancreáticas la enzima está activada por glucosa mientras que en el hígado la regulación es llevada a cabo por la insulina [71]. En los islotes de Langerhans, la GCK se mantiene en niveles constantes, para que pueda mantener su papel como sensor de glucosa. Por el contrario, la expresión de *Gck* hepática requiere insulina y es inhibida por

glucagón adaptándose a periodos de ayuno/alimentación. De este modo, su expresión desaparece del hígado de ratas insulino-deficientes [72].

Además de a las hormonas antes citadas, la GCK responde a hipoxia y estrés metabólico. La acción de la insulina sobre el promotor de la GCK está mediada por HNF4 α [73], depende también de FOXO1 que puede interactuar con HNF4 α disminuyendo su acción sobre la GCK [74] y también de SREBP1c [75] y PPAR γ .

Los cambios nutricionales, además de regular la expresión génica de GCK, también regulan su actividad. En periodos postprandiales, el aumento de glucosa e insulina incrementa la actividad glucoquinasa, mientras que durante el ayuno disminuye [72, 76].

Por otro lado, la actividad GCK puede ser regulada por metabolitos, los Acil-CoA de cadena larga son inhibidores competitivos en células hepáticas y β pancreáticas [77, 78]. Así, el Palmitoil-CoA y el Oleil-CoA se unen a un sitio alostérico inhibiendo la fosforilación de glucosa [65, 76].

Además, la GCK hepática está regulada por su proteína reguladora (GCKR) y por compartimentación celular [79]. La GCKR se encuentra principalmente localizada en el núcleo de los hepatocitos, pero la localización celular de la GCK depende del estado metabólico de la célula. A concentraciones bajas de glucosa, la GCK se asocia con la GCKR formando un complejo inactivo secuestrado en el núcleo, mientras que cuando la concentración de glucosa aumenta, el complejo se disocia y la GCK vuelve al citoplasma para fosforilar la glucosa [80, 81]. En mamíferos, la formación del complejo GCK/GCKR está favorecido por Fructosa 6-fosfato, que aumenta al activarse la glucogenolisis o gluconeogénesis, e inhibido por Fructosa 1-fosfato, que se produce por la fosforilación de fructosa cuando la dieta es rica en carbohidratos [82, 83] (**Figura 9**).

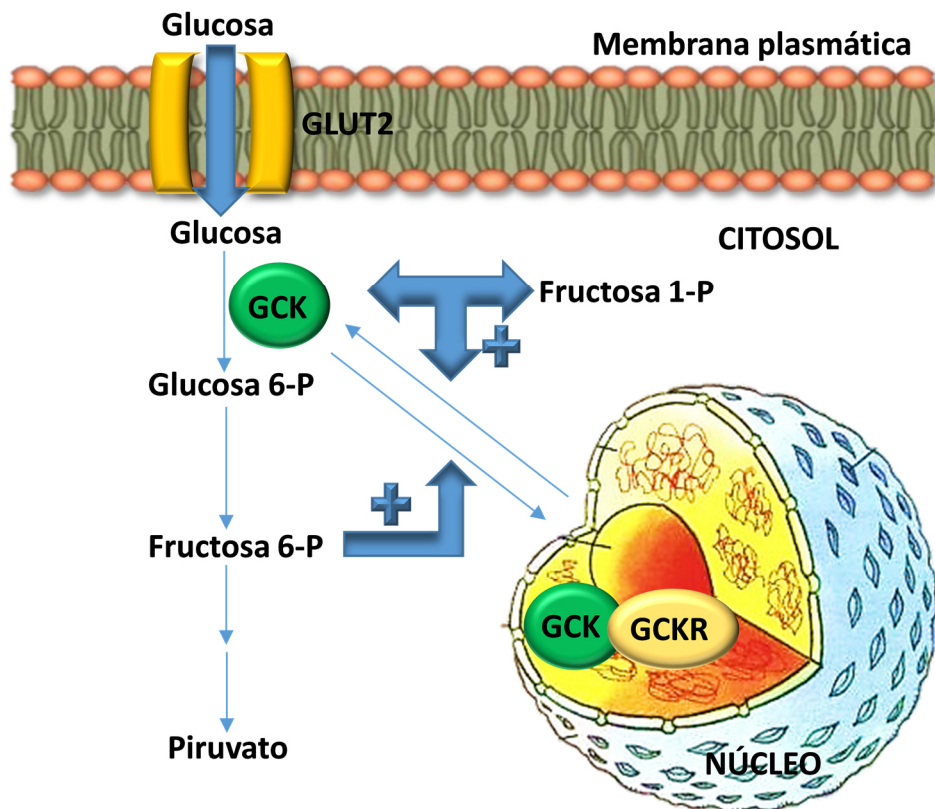


Figura 9. Regulación del tráfico intracelular de la enzima glucoquinasa (GCK). Se muestra la regulación de la GCK por su proteína reguladora (GCKR) y la compartimentación celular. En periodos de alimentación, cuando las concentraciones de glucosa son altas, la GCK se mantiene en citosol para llevar a cabo la fosforilación de la glucosa. Por el contrario, el descenso de glucosa favorece la formación de un complejo con la GCKR y su retención en el núcleo. A su vez este proceso, está inhibido por Fructosa 1-P y favorecido por Fructosa 6-P.

La GCKR no sólo mantiene a la GCK en el núcleo secuestrada, sino que también estabiliza y protege a la enzima de la degradación, ya que se ha visto que la ausencia de GCKR provoca la pérdida de GCK y de su actividad en el hígado [84].

A su vez, la GCKR también se encuentra regulada por diferentes mecanismos:

- La Fosforilación en Ser por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) aumenta la inhibición y la translocación al núcleo de GCK por GCKR [85]

- La acetilación por p300, una acetiltransferasa, disminuye su ubiquitinación e incrementa su afinidad por GCK, por tanto produce una mayor retención en el núcleo y un menor flujo glucolítico [86]

La GCK interacciona también con otras proteínas. Concentraciones altas de glucosa favorecen su unión en el citoplasma con la enzima Fosfofructoquinasa 2/fructosa bisfosfatasa 2 (PFK-2/FBPasa-2), que actúa como un activador endógeno de la GCK [87].

2.2 GCK y homeostasis de glucosa y lípidos

Se ha observado que los ratones en los que se ha inactivado el gen de la GCK presentan hiperglucemia en ayuno y una disminución de la tolerancia a glucosa, sin embargo, aquellos en los que la GCK está sobreexpresada presentan bajos niveles de glucosa en sangre durante periodos de ayuno y una mejora en la tolerancia a glucosa [88, 89]. Esto indica la importancia de la GCK en la regulación de los niveles de glucosa en plasma durante periodos de ayuno/alimentación. Es más, las mutaciones activadoras o inhibidoras de la GCK conducen a síndromes de hipoglucemia e hiperglucemia y son conocidas como enfermedades de la glucoquinasa [90]. Un ejemplo es la diabetes monogénica de aparición temprana (MODY) que afecta a pacientes con mutaciones en el gen de la *Gck*. Estos presentan menor secreción de insulina [91], y debido a la deficiencia funcional de la GCK además:

- Hiperglucemia, tanto en ayuno como en estado postprandial.
- Disminución en la absorción de glucosa y síntesis de glucógeno.
- Defectos en la síntesis de insulina estimulada por glucosa.

También se ha visto que personas con diabetes tipo 2 presentan una actividad glucoquinasa defectuosa afectando al flujo glucosa/Glc6P. Este defecto contribuye a las

Introducción

principales características de esta enfermedad [92]. La expresión de la GCK ha sido relacionada con la obesidad y se ha descrito que personas diabéticas con HbA1c > 7.0 presentan una disminución de la actividad y de la expresión de la GCK [93-95]. En cambio, fármacos activadores de la glucoquinasa (GKAs) aumentan la actividad de la GCK y su afinidad por glucosa, y disminuyen los niveles de glucosa en sangre, tanto en condiciones normales, como en diabetes, incrementando la liberación de insulina y frenando la producción de glucosa por el hígado. Por ello son usados como terapia en la diabetes [90].

La GCK hepática también mantiene la homeostasis lipídica. Se ha visto que la expresión de genes glucogénicos y lipolíticos está regulada por GCK y SREBP1c conjuntamente, que actúan vía ChREBP [64]. Esta acción conjunta es necesaria para la expresión de los genes *L-pk*, *Acc* y *Fas*, ya que ratones KO para GCK presentan bajos niveles de ChREBP y por tanto, una pérdida de su efecto regulador sobre los genes descritos.

3 PROTEÍNA QUINASA CON DOMINIOS PAS (PASK)

La PASK, también denominada PASKIN, es una enzima muy conservada desde levaduras hasta humanos y en mamíferos está involucrada en la regulación del metabolismo energético y mantenimiento de la homeostasis celular [96].

3.1 Estructura y regulación

La PASK contiene un dominio catalítico serina/treonina quinasa y dos dominios PAS (PAS A y PAS B) localizados en el extremo en N-terminal que detectan parámetros ambientales como luz, oxígeno y estado redox [97]. Es activada por pequeños metabolitos y regula la síntesis de glucógeno y de proteínas [96].

La estructura típica del dominio PAS está constituida por 5 láminas β antiparalelas rodeadas por varias α -hélices que pueden unir pequeñas moléculas. Además, posee un

segmento en bucle (F_{α}/FG) que facilita la unión entre el dominio PAS y el dominio quinasa [98, 99].

En general, la regulación de esta familia de quinasas se pueden explicar por: autofosforilación o por la existencia de un pequeño bucle cerca del sitio activo del dominio catalítico, llamado bucle de activación [100]. En el caso de la PASK, la fosforilación dentro del bucle de activación no es clave para su actividad [101]. Su activación podría regularse a través del dominio PAS A en la región N-terminal, que puede interaccionar con el dominio serina/treonina quinasa inactivandola [101]. Sin embargo, la interacción del dominio PAS con un ligando o metabolito específico provoca cambios estructurales que dan lugar a la separación del dominio PAS y la activación del dominio quinasa (**Figura 10**).

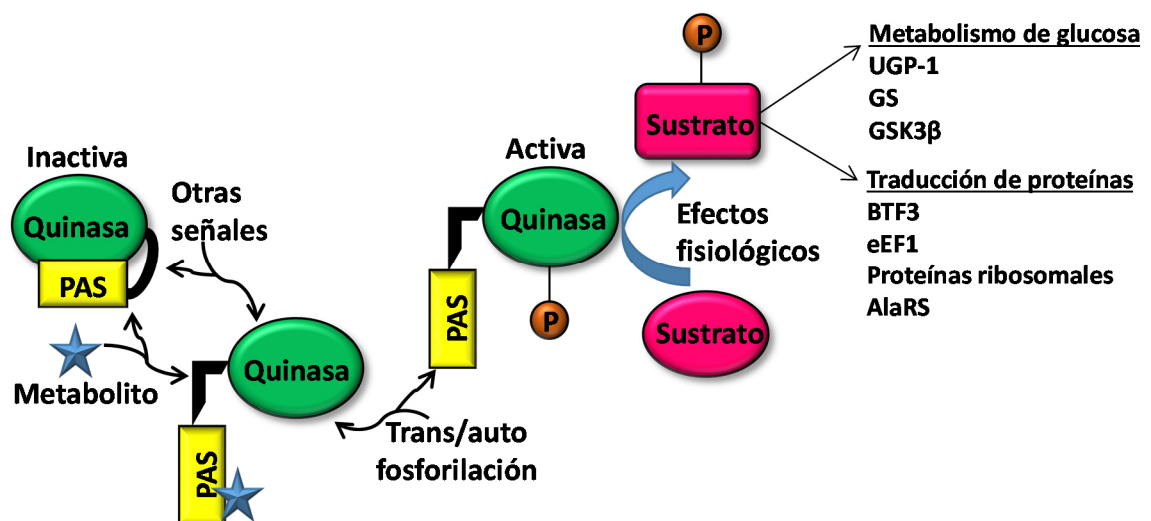


Figura 10. Modelo de activación de la proteína quinasa con dominios PAS (PASK). Tras la unión de un metabolito, la PASK se autofosforila, y como consecuencia de ello incrementa la fosforilación de determinados sustratos con efectos fisiológicos. Estos sustratos están implicados en el metabolismo de glucosa: UGP-1 (UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransfera) en levaduras y GS (Glucógeno Sintasa) y GSK3 β (Glucogeno sintasa quinasa 3 β) en mamíferos. Por otro lado, la PASK modula la transcripción y traducción de proteínas, regulando: BTF3 (Factor de transcripción básico 3), eEF1 (Factor eucariota de elongación traduccional), proteínas ribosomales y AlaRS (Alanil-ARNt sintetasa). Adaptado de [102].

3.2 Papel de PASK como regulador energético

PASK se expresa en islotes pancreáticos tanto de humanos como de ratón, aunque en niveles bajos con respecto a otros tejidos, como hígado, cerebro y testículos. En el caso de ratones, la PASK se expresa al mismo nivel en células α y β pancreáticas y está implicada en la secreción de ambas hormonas, insulina y glucagón [103].

PASK regula la expresión de insulina a través del factor PDX1 (*“pancreatic and duodenal homeobox 1”*), un factor de transcripción esencial para el desarrollo del páncreas y la función de células β pancreáticas, tanto en ratones como en humanos. La ausencia de PASK, disminuye la expresión de la preproinsulina y del PDX1 a concentraciones elevadas de glucosa [104]. PASK fosforila la GSK3 β inactivándola, evitando su acción sobre PDX1 y favoreciendo su estabilidad y la expresión de insulina [105]. En cuanto al glucagón, la PASK regula su liberación a través de la regulación del contenido de insulina [103].

PASK es también importante en el desarrollo de las células α y β pancreáticas, lo que también evidencia su papel clave en la diabetes tipo 2 [106]. Así, a pesar de que la delección de PASK no afecta la secreción de insulina estimulada por glucosa ni a los niveles de insulina en respuesta al ayuno y realimentación, si disminuye la masa de células β pancreáticas en animales KO específicos en estas células. Por el contrario, la delección de PASK en células α pancreáticas mejora la secreción de glucagón *in vivo* e *in vitro*. Por lo tanto, PASK tiene un claro papel en la secreción de glucagón y en el desarrollo de precursores de células β .

El gen de la PASK, además de estar regulado por glucosa, en cerebro está regulado por el péptido similar al glucagón tipo 1/Exendina-4 (GLP-1/Ex4), un péptido anorexigénico y antidiabetogénico. Asimismo, en los ratones deficientes en PASK, están reducidos los efectos reguladores de la Ex4 sobre la actividad de los sensores metabólicos en ciertas

regiones hipotalámicas y el efecto anorexigénico de este péptido. Por tanto, la PASK es necesaria para que el GLP-1/Ex4 lleve a cabo estas acciones [107].

Por otro lado, debido a su papel como sensor de nutrientes, a PASK se le considera un regulador del metabolismo de glucosa y lípidos. Se ha propuesto que puede funcionar de modo similar a otros sensores metabólicos como la AMPK y el complejo mTOR [107, 108].

En mamíferos, PASK regula y bloquea la síntesis de glucógeno en el hígado. Este efecto se lleva a cabo por la fosforilación en Ser-640 e inactivación de la GS, enzima limitante de la glucogenogénesis. Su interacción está regulada negativamente por 2 factores: el dominio PAS y el propio glucógeno [109].

PASK también está implicada en la regulación de genes lipogénicos a través de SREBP1c. Se ha descrito que PASK media la maduración proteolítica de SREBP1c inducida por la insulina en hígado. Aunque, la presencia de PASK no parece necesaria para la activación de SREBP1c en todos los tejidos [110].

También se ha descrito que las acciones de PASK son específicas de tejido. Su activación en hepatocitos incrementa la síntesis y acumulación de lípidos, mientras que en el músculo esquelético esta activación conlleva un menor metabolismo oxidativo y producción de ATP a partir de la oxidación de carbohidratos y ácidos grasos [111].

Inicialmente, cuando se fenotiparon los ratones deficientes en PASK, no presentaban defectos en la reproducción, crecimiento y desarrollo, sin embargo, posteriormente se han detectado diferencias metabólicas en respuesta a las dietas ricas en grasas (HFD). De este modo, estos ratones son resistentes al desarrollo de obesidad inducida por HFD, posiblemente como consecuencia de una alta tasa metabólica en el músculo esquelético. Además, presentan bajos niveles circulantes de insulina y triglicéridos. Así pues, están

Introducción

protegidos frente a las consecuencias perjudiciales de estas dietas: hiperglucemia, desarrollo de esteatosis hepática y son más sensibles a la insulina y tolerantes a la glucosa [111].

Asimismo, sabemos que la deficiencia de PASK altera la respuesta a glucosa y nutrientes de las vías AMPK y mTOR/S6K en células silenciadas para PASK y en las áreas hipotalámicas implicadas en el control de la ingesta y en el hígado de ratones deficientes en PASK [107, 108].

Además, PASK puede actuar como un regulador autónomo del equilibrio energético a nivel celular y de enfermedades metabólicas humanas, ya que su expresión está disminuida y no responde a glucosa en los islotes de pacientes con diabetes tipo 2 [103].

Todas estas evidencias sugieren que PASK puede ser una importante diana terapéutica contra la diabetes tipo 2 y el desarrollo de esteatosis hepática.

4 REGULACIÓN POR microARNs (miARNs)

Los miARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificante compuestas por 20-22 nucleótidos. El conocimiento sobre los miARNs está aumentando progresivamente y hoy se sabe que están implicados en la regulación postranscripcional de numerosos genes y en multitud de enfermedades [112, 113].

En 1993, se descubrió el primer miARN del gen *lin-4* [114]. Los miARNs son reguladores postranscripcionales de muchos genes, inhibiendo su expresión. Para ello se aparean con ARN mensajeros (ARNm) diana, degradándolos o impidiendo la traducción [115].

4.1 miARNs y enfermedades metabólicas

Hay varios miARNs que presentan un papel importante en la producción y secreción de insulina, en el desarrollo de islotes pancreáticos o en el metabolismo de glucosa, por ejemplo: miR-375, miR-206 o el miR-143, mientras que otros están más implicados en el metabolismo lipídico: miR-122, miR-33 o miR-107 (**Tabla 3**).

miARNs	TEJIDO	FUNCIÓN
miR-375	Islotes pancreáticos	<ul style="list-style-type: none"> Disminuye expresión del gen de la insulina y la síntesis de proteínas [116] Formación de islotes pancreáticos [117]
miR-206	Islotes pancreáticos	<ul style="list-style-type: none"> Desregulación de <i>Gck</i> [118]
miR-122	Hígado	<ul style="list-style-type: none"> Regulación del metabolismo lipídico [119]
miR-143	Adipocitos	<ul style="list-style-type: none"> Desarrollo de adipocitos [120] Papel en el metabolismo lipídico y en la homeostasis de glucosa [121]
miR-33	Hígado y cerebro	<ul style="list-style-type: none"> Regulación del metabolismo de colesterol, ácidos grasos y glucosa [122]
miR-103/107	Cerebro	<ul style="list-style-type: none"> Regulación de genes del metabolismo lipídico [123]

Tabla 3. miARNs en el metabolismo. La tabla muestra algunos de los principales miARNs (microARNs) implicados en el metabolismo. Se indica el tejido donde se expresa mayoritariamente y la función en la que están implicados. Este trabajo se ha centrado en el estudio de miR-33 y miR-143 cuyas funciones se explican más detalladamente.

El miR-143 se encuentra desregulado en la obesidad inducida por HFD [124, 125] y su sobreexpresión afecta a la activación de Akt por insulina y a la homeostasis de glucosa y provoca aumento del peso corporal. Además, miR-143 juega un papel en el desarrollo de adipocitos, ya que está regulado positivamente durante esta adipogénesis. Su inhibición disminuye la diferenciación acompañado de una disminución en el acúmulo de triglicéridos y una reducción de genes importantes en los adipocitos como el gen *Pparγ* [120]. Ratones deficientes en miR-143 están protegidos del desarrollo de resistencia a insulina inducida por obesidad [121].

Introducción

MiR-33a y -33b son importantes reguladores del metabolismo del colesterol, de los ácidos grasos y de la glucosa. MiR-33a/b se encuentran dentro de intrones del SREBP, y están involucrados en la síntesis y absorción de colesterol [122]. Se ha visto que el silenciamiento de miR-33 aumenta los niveles de las HDL (Lipoproteínas de alta densidad) promoviendo el transporte reverso del colesterol. Este miARN reduce la β -oxidación de ácidos grasos y la secreción de insulina, ya que inhibe la expresión de CPT1 α e IRS2, respectivamente [126].

Debido a su papel en diferentes enfermedades, los miARNs están surgiendo como importantes dianas terapéuticas para su tratamiento.

Anti-miARNs	EFEECTO
Anti-miR-375	<ul style="list-style-type: none">• Aumento de <i>Pdk1</i> y de la liberación de insulina [116]
Anti-miR-122	<ul style="list-style-type: none">• Reduce niveles de colesterol y esteatosis hepática [119]
Anti-miR-33	<ul style="list-style-type: none">• Reduce placas de ateroma, contenido lipídico y genes inflamatorios• Aumenta marcadores de estabilidad plaquetaria, oxidación de ácidos grasos y señalización de insulina [126, 127]
Anti-miR-107/103	<ul style="list-style-type: none">• Mejora del metabolismo de glucosa y de la sensibilidad a insulina [128]

Tabla 4. Anti-miARNs en el tratamiento de enfermedades. En la tabla se muestra los efectos que tiene la utilización de anti-miARNs en la mejora de las principales enfermedades metabólicas.

Existen varios métodos para regular los niveles de miARNs *in vivo*, entre ellos se encuentra el uso de anti-miARNs [129] (**Tabla 4**).

5 DIABETES, OBESIDAD Y ALTERACIONES HEPÁTICAS

La obesidad y las enfermedades derivadas de ésta, son actualmente un problema creciente en nuestra sociedad y están comenzando a alcanzar números de pandemia, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo.

La obesidad se produce por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. Cuando el consumo de energía excede a la combustión de calorías, la energía sobrante se almacena en forma de grasa en el tejido adiposo, dando lugar a obesidad [10]. Es causada por una interacción entre factores ambientales, predisposición genética y el comportamiento. Puede dar lugar a enfermedades como diabetes tipo 2, cáncer, hipertensión, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, enfermedades hepáticas, depresión y artritis. La reducción de peso mejora o previene estas enfermedades asociadas [130, 131] .

La diabetes tipo 2 es la forma predominante de diabetes mellitus. Se produce por el desarrollo de una resistencia a insulina debido a un fallo de la sensibilidad tisular para responder a esta hormona y esto da lugar a hiperinsulinemia debido al aumento de la producción de insulina para compensar la falta de respuesta a ésta. Por tanto, implica cambios tanto en la secreción como en la acción de la insulina y esta situación se agrava en personas obesas. Los tejidos fallan a la hora de absorber y almacenar glucosa, dando lugar a hiperglicemia. A largo plazo, se puede producir una secreción insuficiente de insulina [2]. A su vez, la diabetes tipo 2 puede dar lugar a otro tipo de desorden metabólico denominado síndrome metabólico.

El síndrome metabólico o síndrome de resistencia a insulina se caracteriza por alteraciones cardiovasculares y dislipidemia (baja concentración de HDL y alta de lipoproteínas de baja densidad (LDL)) [132, 133]. Presenta síntomas similares a la diabetes como hiperinsulinemia o hiperglicemia. Es el principal factor de riesgo para la aparición de enfermedades vasculares y diabetes tipo 2, incluso se relaciona con la aparición de ciertos

Introducción

cánceres como el de colon. Además, es la principal causa de esteatosis hepática que progresa a hígado graso.

Inicialmente, la enfermedad del hígado graso o esteatosis hepática se asociaba con el consumo excesivo de alcohol, pero en los últimos años están apareciendo casos cuyas causas no son por el alcohol dando lugar a esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD). Se caracteriza por una acumulación de grasa en los hepatocitos, entre un 5 y 10% por encima de lo normal. Debido a esto, los casos de esteatosis son más frecuentes en personas obesas y diabéticas. La esteatosis hepática va acompañada del desarrollo de esteatohepatitis y fibrosis que puede culminar en el desarrollo de cirrosis o cáncer hepático [10]. Estos pacientes también presentan resistencia a insulina de ahí su relación con el síndrome metabólico.

Estas enfermedades están relacionadas con alteraciones de algunos factores de transcripción implicados en la regulación del metabolismo lipídico. Por ejemplo, la inhibición de PPAR α provoca una severa esteatosis porque se impide la regulación de la β -oxidación, provocando una acumulación de ácidos grasos. Por el contrario, la sobreexpresión de PPAR γ o el incremento de SREBP1c en ratones obesos han sido asociados al desarrollo de esteatosis [10].

El estudio de los mecanismos que conducen al desarrollo de la obesidad, se basan en modelos de ratones obesos o en tratamientos con HFD [134]. Los animales alimentados con HFD, (30-78% de la energía total), incrementan rápidamente su grasa corporal por lo cual son un modelo óptimo para el estudio de la obesidad, sin embargo, los ratones *Pask*^{-/-} son resistentes al desarrollo de la obesidad inducida por este tipo de dieta [135], lo que les hace

muy atractivos para identificar los mecanismos que los convierten en resistentes a esta patología.

6 AGENTES ANTIDIABETOGÉNICOS. PAPEL DEL PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN TIPO 1 (GLP-1)

Debido a las consecuencias económicas y sociales que tiene el aumento progresivo de la diabetes y obesidad, durante muchos años se han desarrollado fármacos para tratarlas pero algunos presentaban poca efectividad y muchos efectos secundarios. En los últimos años se están produciendo fármacos efectivos reguladores del apetito que actúan sobre el eje intestino-cerebro.

Para el tratamiento de la diabetes/obesidad y sus consecuencias, se han desarrollado terapias basadas en incretinas. Las incretinas son hormonas peptídicas secretadas por el intestino, cuya función es el aumento de la secreción de insulina estimulada por la ingesta oral de glucosa. El péptido inhibitorio gastrointestinal (GIP) fue la primera incretina que se aisló seguido del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) [136].

6.1 Estructura del GLP-1

El GLP-1 es un péptido de 30 aminoácidos [136, 137] que proviene del procesamiento postraduccional del proglucagón. Es sintetizado en células L intestinales y células β pancreáticas y es liberado en respuesta a la ingesta. Además, el proglucagón también puede ser sintetizado en la médula oblongata y en el hipotálamo, que se cree que son los primeros sitios donde actúa este péptido en el SNC [138].

El procesamiento postraduccional del proglucagon es dependiente del tejido donde se sintetiza y da lugar a diferentes productos resumidos en la **Figura 11** [139, 140].

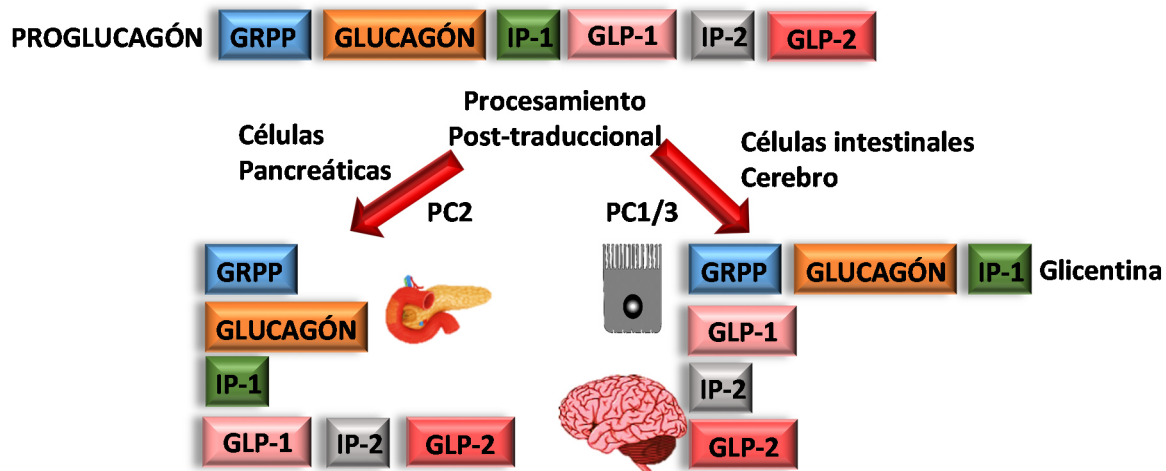


Figura 11. Procesamiento del proglucagón. Figura que indica el diferente procesamiento del proglucagón en páncreas, intestino y cerebro. GRPP (polipeptido pancreático relacionado con glicentina), IP-1 y IP-2 (polipéptidos intermedios 1 y 2) y GLP-1 y GLP-2 (polipéptido similar al glucagón tipo 1 y 2). Estas modificaciones postraduccionales son llevadas a cabo por las convertasas (PC), en el páncreas por la PC2 y en el intestino por la PC1/3 [138, 141].

El GLP-1 tiene una vida media corta en la circulación (1-2 min) porque es rápidamente inactivado por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) que reconoce el sitio N-terminal y lo degrada [142].

6.2 Regulación de la secreción del GLP-1 y mecanismo de acción

Es una hormona intestinal que se sintetiza en respuesta a la entrada de nutrientes [143]. En condiciones de ayuno sus niveles son muy bajos aumentando después de las comidas, haciéndose más notable su secreción 10 minutos después de la ingesta [138]. El mecanismo por el cual los nutrientes provocan la secreción de GLP-1 es poco conocido.

Ejerce su efecto a través del receptor de GLP-1 (GLP1-R), un receptor transmembrana de 64 kDa acoplado a proteínas $G\alpha_s$ [144]. Este receptor está presente principalmente en células α y β pancreáticas, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, riñones y pulmones [145].

Su acción es dependiente de la vía de la Adenilato Ciclasa (AC). En las células β pancreáticas, la unión del agonista a su receptor provoca la activación de la AC y la consecuente producción de AMPc. El aumento de AMPc activa 2 vías implicadas en la regulación de las células β : la vía de la PKA y la vía de factores que intercambian nucleótidos de guanina (GEFs) [141]. El resultado final es que la acción coordinada de estas dos vías conduce a la secreción de insulina [141] (Figura 12).

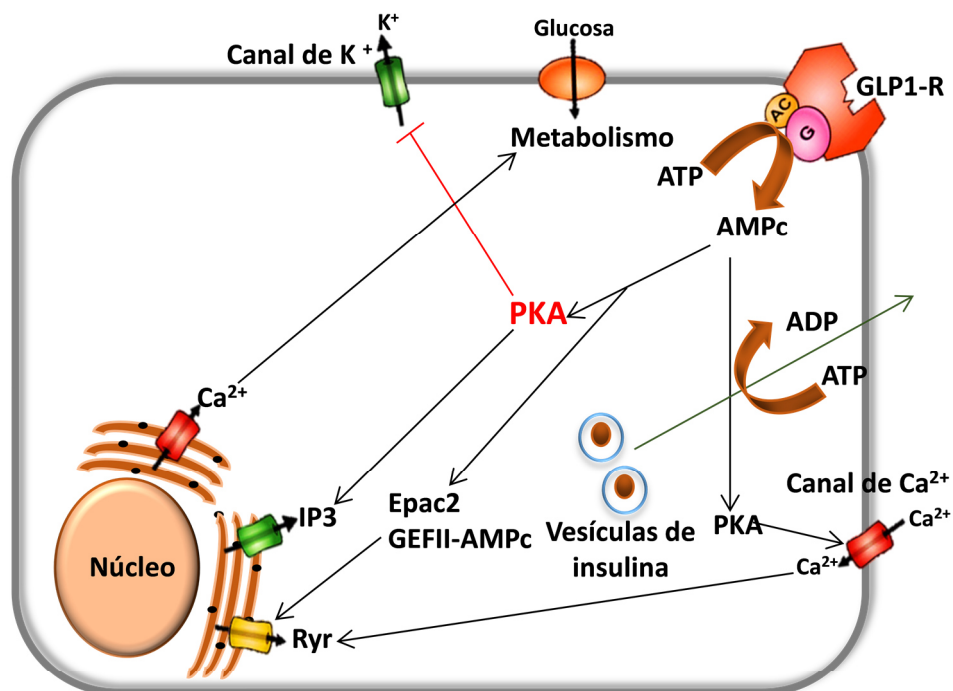


Figura 12. Mecanismo de acción del GLP-1. El GLP-1 (Péptido similar al glucagón tipo 1) se une a su receptor (GLP1-R) provocando un aumento del AMPc (Adenosín monofosfato cíclico), que tiene como consecuencia la activación de la PKA (Proteína quinasa A) y de Epac1 y 2 (Factor de intercambio de nucleótidos de guanina activado por AMPc). Una vez activadas, la PKA y EPac2 inhiben los canales de K⁺ impidiendo su salida mientras que activan la salida de IP3 (Inositol trifosfato) y de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (Ryr). Todo ello conduce al aumento de Ca²⁺ intracelular y a la secreción de insulina.

Por otro lado, tenemos la vía de la PI3K. La activación de PI3K por GLP-1 es compleja. La PI3K, como se ha descrito previamente, activa a la PKB, que juega un papel en la proliferación y supervivencia de células β . A su vez, PI3K también tiene como diana a IRS2 y hay evidencias que GLP-1 puede activar IRS2 mediante fosforilación en tirosina [141].

6.3 Acciones fisiológicas

Este péptido intestinal puede alcanzar el hipotálamo a través de fibras aferentes vagales o por la circulación sanguínea atravesando la barrera hematoencefálica. Además, puede directamente ser producido por el mismo hipotálamo, donde actúa regulando el apetito, promoviendo señales de saciedad.

El GLP-1 liberado por las células L intestinales, difunde por la lámina basal y entra en los capilares situados en la lámina propia hacia la circulación sanguínea donde comienza a actuar la DDP-4 [138].

Las principales acciones fisiológicas del GLP-1 quedan resumidas en la **Figura 13**.

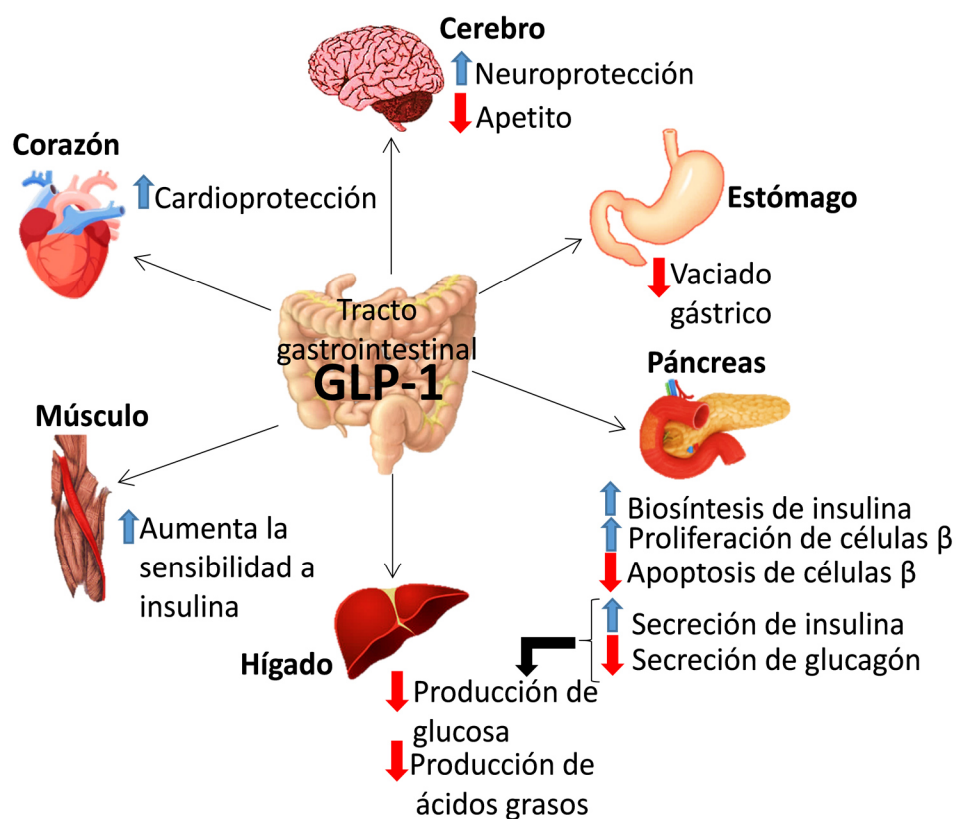


Figura 13. Esquema de los efectos fisiológicos del GLP-1 sobre los diferentes órganos. El GLP-1, liberado del tracto gastrointestinal, tiene efectos beneficiosos en diferentes tejidos. Adaptado de [146].

6.4 Agonistas del receptor de GLP-1 y su papel en obesidad

Los agonistas del receptor de GLP-1 mimetizan las acciones fisiológicas del GLP-1 endógeno mejorando el control glucémico, la pérdida de peso y parámetros lipídicos, y por tanto disminuyendo factores de riesgo cardiovasculares.

Dentro de ellos, destaca la Exendina-4 (Ex4) utilizada para el tratamiento de diabetes tipo 2. La Ex4 es un péptido de 39 aminoácidos, análogo del GLP-1, que comparte el 53% de su secuencia. Se obtuvo por primera vez de glándulas salivares del lagarto monstruo de Gila (*Heloderma Suspectum*). La Ex4 es resistente a la acción de la DPP-4 porque no posee un sitio de reconocimiento en el extremo N-terminal, por lo tanto tiene una mayor estabilidad *in vivo*, ya que tras ser inyectada, perdura intacta en plasma durante 4-5 horas y se elimina de forma renal [136, 141].

Al igual que el GLP-1 nativo, la Ex4 restablece los niveles de insulina en individuos diabéticos, es un potente inhibidor gástrico y produce pérdida de peso [141]. Pero, interesantemente, tiene un efecto más potente que el GLP-1 nativo, ya que las acciones antihiper glucémicas, insulino trópicas y glucanostáticas son más perdurables.

El papel del GLP-1 en obesidad es importante debido a su acción sobre la ingesta y la saciedad. Además, se ha visto que individuos obesos presenta una reducción en la secreción de GLP-1 y tienen una menor respuesta postprandial [147].

Un problema en las personas que padecen síndrome metabólico es la resistencia a insulina por eso es necesario un agente que mejore esta resistencia. Se ha descrito que la Ex4 mejora la resistencia a insulina en ratones obesos y disminuye el almacenamiento lipídico en el hígado. Además, estos ratones presentan menor ganancia de peso corporal y

Introducción

de peso del hígado [148]. También hay evidencias que el tratamiento con Ex4 tiene efectos beneficiosos en personas obesas que padecen diabetes tipo 2 [149].

El tratamiento con GLP-1/Ex4 reduce la expresión de genes que regulan síntesis de ácidos grasos como el *Scd1*, *Srebp1c* y *Acc*. Por el contrario, incrementa la expresión de genes que regulan la oxidación de ácidos grasos como el *Ppara* y mejora el metabolismo de glucosa hepático. Esto conduce a una reducción en la síntesis de ácidos grasos y almacenamiento de triglicéridos y a una mejora de la β -oxidación. Todo esto puede ser beneficioso en el tratamiento de NAFLD [148].

El **objetivo general** de esta tesis fue analizar el papel de PASK y otros sensores metabólicos en la adaptación del hígado a la regulación metabólica por ayuno y alimentación, así como estudiar el efecto de la carencia de PASK sobre otros sensores metabólicos que facilitan la homeostasis metabólica. Además, se propuso estudiar los cambios en los mecanismos de respuesta adaptativa a cambios nutricionales producidos por una dieta alta en grasa y el papel de la PASK en ello. Por último, se determinará el papel regulador de la Exendina-4 (Ex4) en la adaptación hepática al ayuno/alimentación y la mediación de PASK en él.

En concreto, los **objetivos propuestos** fueron:

- Estudiar el efecto del estado nutricional y la carencia de PASK sobre la expresión y actividad de la glucoquinasa (GCK). Así como la expresión de su proteína reguladora (GCKR).
- Determinar la regulación por ayuno/alimentación de los factores de transcripción y las enzimas de las principales rutas metabólicas hepáticas en ratones controles y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}), para valorar cómo la deficiencia de PASK afecta a la homeostasis metabólica.
- Examinar el efecto regulador de la Ex4 sobre la expresión de sensores metabólicos, factores de transcripción y enzimas claves de las principales rutas metabólicas en su adaptación a distintas condiciones metabólicas.
- Analizar, *in vivo*, las consecuencias de una dieta rica en grasa sobre los diferentes parámetros bioquímicos en ratones controles y *Pask*^{-/-}.
- Investigar el papel de PASK y otros sensores metabólicos en la resistencia al desarrollo de la obesidad, analizando el efecto que una dieta rica en grasa tiene

Objetivos

en las respuestas de adaptación en condiciones de ayuno y alimentación sobre la expresión y actividad de la GCK. Así como la expresión de GCKR.

- Comparar los mecanismos moleculares de adaptación del hígado, factores de transcripción y enzimas de las principales rutas metabólicas, de ratones *Pask*^{-/-} y control en respuesta a dietas altas en grasa, para entender el mecanismo molecular que confiere a los ratones deficientes en PASK resistencia al desarrollo de obesidad.
- Determinar si la deficiencia de PASK afecta a la expresión de algunos miARNs que pueden estar alterados por obesidad.

MATERIALES y MÉTODOS

1 EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

1.1 Animales de experimentación

Todos los procesos que implicaron el uso de animales siguieron las normas para el cuidado de animales especificados por la Unión Europea (Real Decreto 542/2016, BOE núm.297 LEY 32/2007) y aprobadas por el Comité Institucional de Experimentación Animal.

Se utilizaron ratones machos, de 10 a 20 semanas de edad (25-30 g), de la cepa C57BL/6J tipo silvestre (Charles River Laboratories International) y deficientes en la enzima PASK (*Pask*^{-/-}) que fueron generados por el grupo de R. Wenger (Instituto de Fisiología, Universidad de Zurich) [150].

Algunos ratones fueron alimentados con una dieta estándar (SFD; 5,2% por peso, 13% Kcal de grasa) y otros con una dieta de alto contenido en grasa (HFD; 21% de peso, 45% Kcal de grasa (TD.88137, Harlan Teklad)). Fueron alojados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid que cumple con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal (D.C. 86/609/CEE; RD 1201/2005)) a temperatura constante (21°C), y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, con encendido de luces a las 8 de la mañana.

Los estudios se realizaron con los informes favorables del Comité Experimentación Animal y de la Comunidad de Madrid (Ref: 315/15).

1.2 Dieta rica en grasa

Los animales tipo silvestre (WT) y *Pask*^{-/-} fueron alimentados durante 3 meses con una dieta de alto contenido en grasa. Durante este tiempo, para determinar los diferentes efectos que esta dieta puede tener sobre el peso y los parámetros bioquímicos de los ratones WT y *Pask*^{-/-}, se registró semanalmente la ganancia de peso y se midió la glucosa en

Materiales y métodos

sangre de la cola mediante un glucómetro Elite (Bayer Corp., Elkhart, IN, USA), para determinar el efecto que tiene la dieta sobre la glucemia a lo largo del periodo de tratamiento.

1.3 Test de tolerancia a insulina (TTI) y test de tolerancia a glucosa (TTG)

Para valorar la resistencia a insulina desarrollada por los ratones obesos, se realizaron los test de tolerancia a insulina (TTI) y a glucosa (TTG) en ratones WT y deficientes en PASK que habían sido alimentados con SFD y con HFD.

Para el TTG los ratones fueron ayunados durante toda la noche. Tras este periodo de ayuno, se tomó la medida de glucosa en sangre e, inmediatamente, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con glucosa (2 g/kg) diluida en suero salino. Posteriormente se realizaron medidas de glucosa en sangre a distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 min). Estas medidas de glucosa se realizaron en sangre periférica de la cola del ratón mediante un glucómetro Elite (Bayer Corp., Elkhart, IN, USA).

Para el TTI, el ayuno fue de 4 h y se inyectó insulina (1 U/kg peso) diluida en suero salino también de forma intraperitoneal. Las medidas de glucosa en sangre periférica fueron tomadas antes de la inyección de insulina (tiempo 0) y tras la inyección a distintos tiempos (15, 30, 60, 90 y 120 min).

1.4 Tratamiento y extracción de órganos

Los ratones de 3-5 meses WT y *Pask*^{-/-} fueron alimentados con dieta estándar en estado basal o sometidos a un ayuno de 18 o 48 h, antes de sacrificarlos, algunos fueron tratados con Exendina-4 (Ex4) (250 ng/100 g de peso, (Bachem, Bubendorf, Suiza)) diluida en suero salino, inyectada de forma subcutánea durante 3 h, otros después del ayuno fueron realimentados durante 3 h y algunos de ellos también tratados con Ex4 durante el

mismo tiempo. Una vez transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo el sacrificio y la extracción de órganos, que fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a una temperatura de -80 °C hasta su uso.

Los ratones WT y deficientes en PASK, de 3-5 meses, que habían sido sometidos al tratamiento con SFD o HFD, se encontraban en estado basal (alimentados) o fueron sometidos a un ayuno de 48 h antes de su sacrificio y extracción de órganos.

2 DETERMINACIONES EN SANGRE

2.1 Análisis de los niveles de insulina en plasma

Las muestras de sangre de ratones WT y deficiente en PASK alimentados con SFD o con HFD, fueron recogidas utilizando Aprotinina/EDTA (500 Kiu/mL, EDTA 1,2 mg/mL), para evitar la coagulación y la degradación por proteasas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm y el sobrenadante (plasma) fue retirado a otro tubo.

Para determinar el efecto de HFD en los niveles de insulina en sangre de los ratones WT y deficientes en PASK, se utilizó el Kit “Rat/Mouse Insulin ELISA” (Millipore, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este Kit se basa en la captura de las moléculas de insulina de las muestras de sangre a analizar. Las muestras fueron depositadas en pocillos los cuales estaban cubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-insulina. Posteriormente, se produce la unión de un anticuerpo biotinilado a las moléculas capturadas y por último la unión de la peroxidasa a la biotina. La cuantificación del conjugado anticuerpo-enzima y la actividad enzimática fue medida mediante el incremento de absorbancia a 450 nm. Esta medida se realizó en el lector de placas Synergy/HTX multi-mode reader (BioTek).

Materiales y métodos

Los resultados fueron extrapolados sobre una curva estándar de concentraciones conocidas de insulina que se realizó en el mismo experimento.

2.2 Perfil lipídico hepático

Para ver el efecto de la dieta rica en grasa sobre los diferentes componentes lipídicos en ratones WT y deficientes en PASK alimentados con SFD y HFD, se llevó a cabo la medida de parámetros lipídicos en el plasma de los ratones, tales como los niveles de Colesterol total (CHT) y de Triglicéridos (TG) usando el instrumento Roche Cobas b 101 Lipid Control (Roche Diagnostics, Basel, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un sistema de diagnóstico *in vitro* basado en la determinación cuantitativa de los parámetros lipídicos en sangre o plasma mediante una medida fotométrica.

Previamente, las muestras de plasma de ratones WT y deficientes en PASK habrían sido recogidas como se indica en el apartado anterior.

3 EXPRESIÓN GÉNICA

3.1 Extracción de ARN hepático y síntesis de ADNc

Para llevar a cabo la extracción del ARN total del hígado de ratones tipo silvestre C57BL/6J y deficientes en PASK en cada una de las condiciones estudiadas se utilizó el método del TRIZOL (Life Technologies, Barcelona, España), que está basado en el método de Chomczynski [151].

Los fragmentos de tejido fueron homogenizados con TRI Reagent (Life Technologies, Barcelona, España), una solución de isotiocianato de guanidina y fenol, con la ayuda de un POLYTRON PT2100 (Kinematica AG, Suiza). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos celulares.

Para llevar a cabo la fase de separación, al sobrenadante se le añadió 200 µl de cloroformo, se agitó durante 15 s y se mantuvo a temperatura ambiente durante 8 min. La mezcla resultante se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C para separarla en 3 fases: orgánica (proteína), interfase (DNA) y acuosa (RNA).

Para aislar el ARN, la fase acuosa obtenida se pasó a un nuevo tubo y se le añadió 200 µl de 2-propanol para precipitar el ARN, se mezcló y se mantuvo 8 min a temperatura ambiente. De nuevo, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El ARN precipitado fue lavado 2 veces con etanol al 75%. Se agitó la muestra y se centrifugó varias veces a 7.500 rpm durante 10 min a 4 °C. Por último, el “pellet” se dejó secar a temperatura ambiente durante 5-10 min y el ARN se disolvió en 20 µl de agua libre de RNAasas.

La concentración y pureza del ARN extraído fue determinada en el Nanodrop 2000 (Termo Fisher scientific, Massachusetts, USA). La integridad de los ARN se analizó mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y las bandas 28S 18S fueron visualizadas con el CHEMI DOC XRS (Bio-Rad, California, USA).

La síntesis de ADNc fue llevada a cabo siguiendo las instrucciones del protocolo del Kit “High-capacity cDNA archive” (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando 2 µg de ARN como molde en un volumen final de 20 µl de la mezcla de reacción. Para llevar a cabo la retrotranscripción, la mezcla de reacción se incubó a 18 °C durante 10 min, después a 37 °C durante 2 h y finalmente a 92 °C durante 10 min.

3.2 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) (TaqMan® Assay)

Para determinar el grado de expresión de ciertos genes, los niveles de ARNm de *Pask*, *Gck*, *Gckr*, *Glp1r* y *Rn18S* fueron cuantificados por qRT-PCR usando las sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para ello, se realizaron mezclas de reacción con los ADNc obtenidos anteriormente diluidos 1/5, excepto en el caso del gen utilizado para la normalización, *Rn18S*, cuyo ADNc fue diluido 1/200. Los detalles de los oligonucleótidos cebadores se indican en la **Tabla 5**. Se utilizaron 8 µl de ADNc de cada muestra en un volumen final de mezcla de reacción de 40 µl, de los cuales se pipetearon 20 µl por pocillo.

La PCR se realizó en el Sistema PCR Fast Tiempo Real 7300HT (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando una placa de 96 pocillos (Roche diagnostics, Basel, Suiza). Las condiciones para la amplificación fueron: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y a 60 °C durante 1 min. Los resultados fueron normalizados con el gen *Rn18S*. Los datos fueron analizados con el Software System 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tabla 5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (TAQMAN® ASSAY)

Gen (Proteína)	Código de identificación (Taqman® Assay)
<i>Rn18S</i> (18S)	Hs99999901_s1
<i>Gck</i> (GCK)	Mm00439129_m1
<i>Gckr</i> (GCKR)	Mm00523328_m1
<i>Glp1r</i> (GLP1-R)	Mm00445292_m1
<i>Pask</i> (PASK)	Mm00435916_m1

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) (SYBR Green® Assay)

En algunos casos los niveles de expresión del ARNm de algunos genes fue valorada por qRT-PCR utilizando la SYBR Green Master (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar los siguientes genes: *Foxo1*, *Chrebp*, *Ppary*, *Ppara*, *Lxrα*, *Srebp1c*, *Pgc1α*, *Pepck*, *G6Pasa*, *L-pk*, *Fas*, *Scd1*, *Acc*, *Cpt1α*, *M-cad*, *Sirt2* y *β-Actina*. Los detalles de las sondas están indicados en la **Tabla 6**.

Para la cuantificación, se realizaron curvas estándar de los diferentes genes basadas en diluciones seriadas del ADNc de una de las muestras. A partir de estas curvas, se determinó la dilución más apropiada para cada gen 1/10 o 1/100.

La PCR fue desarrollada por el sistema PCR Fast Tiempo Real 7300HT (Applied Biosystems, Foster City, CA), de nuevo en una placa de 96 pocillos (Roche diagnostics, Basel, Suiza). Las condiciones para la amplificación fueron: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min y una curva de disociación de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min y de nuevo 95 °C durante 15 s. Los resultados fueron normalizados con el gen *β-Actina* (con ADNc diluido 1/200). Los datos fueron analizados con el Software System 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

**Tabla 6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA A TIEMPO REAL
(SYBR GREEN® Assay)**

Gen (Proteína)	Oligonucleótido Directo Ratón	Oligonucleótido Reverso Ratón
<i>Acc</i> (ACC)	5'-CCTCTTCCTGACAAACGAG-3'	5'-TCCATACGCCTGAAACATG-3'
<i>Actb</i> (β-ACTINA)	5'-CTCTCTTCCAGCCTTCCTTC-3'	5'-GGTCTTTACGGATGTCAACG-3'
<i>Cpt1α</i> (CPT1A)	5'-CATGTCAAGCCAGACGAAG-3'	5'-TGGTAGGAGAGCAGCACCT-3'
<i>Chrebp</i> (ChREBP)	5'-CTGGGGACCTAAACAGGAGC-3'	5'-GAAGCCACCCTATAGCTCCC-3'
<i>Fas</i> (FAS)	5'-AAGGCTGGGCTCTATGGATT-3'	5'-GGAGTGAGGCTGGGTTGATA-3'
<i>Foxo1</i> (FOXO1)	5'-GACAGCCGCGCAAGACCAG-3'	5'-TGAATTCTTCCAGCCCGCC-3'
<i>G6Pasa</i> (G6PASA)	5'-TTACCAAGACTCCAGGACTG-3'	5'-GAGCTGTTGCTGTAGTAGTCG-3'
<i>L-pk</i> (L-PK)	5'-TTGCTCTACCGTGAGCCTC-3'	5'-ACCACAATCACCAGATCAC-3'
<i>Lxra</i> (LXRA)	5'-GCCCTGCACGCCTACGT-3'	5'-TAGCATCCGTGGGAACATCA-3'
<i>M-cad</i> (MCAD)	5'-TTCGAAGACGTCAGAGTGC-3'	5'-GCGACTGTAGGTCTGGTTC-3'
<i>Pepck</i> (PEPCK)	5'-CCACAGCTGCAGAACA-3'	5'-GAAGGGTCGCATGGCAAA-3'
<i>Pgc1α</i> (PGC1α)	5'-ATGTGTCGCCTTCTTGCTCT-3'	5'-ATCTACTGCCTGGGGACCTT-3'
<i>Ppara</i> (PPARα)	5'-TGTTTGTGGCTGCTATAATT-3'	5'-GCAACTTCTCAATGTAGCCTA-3'
<i>Pparγ</i> (PPARγ)	5'-GTGCCAGTTTGCATCCGTAGA-3'	5'-GGCCAGCATCGTGTAGATGA-3'
<i>Scd1</i> (SCD1)	5'-CTGACCTGAAAGCCCGAAG-3'	5'-GCGTTGAGCACCAGAGTGTA-3'
<i>Sirt2</i> (SIRT2)	5'-AGCCAACCATCTGCCACTAC-3'	5'-CCAGCCCATCGTGTATTCTT-3'
<i>Srebp1c</i> (SREBP1C)	5'-GGAGCCATGGATTGCACTT-3'	5'-GCTTCCAGAGAGGAGGCCAG-3'

4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE microARNs (miARNs)

4.1 Extracción de ARN hepático

Para el estudio de los miARNs, los hígados de ratones WT C56BL/6J y deficientes en la enzima PASK alimentados con SFD o HFD, en cada una de las condiciones a analizar, fueron lisados en QIAzol Lysis (QIAGEN, Hilden, Alemania) con la ayuda de unas bolas metálicas (Bio-Rad, California, USA).

Posteriormente, se extrajo el ARN del hígado utilizando columnas Rneasy mini siguiendo el protocolo del kit de extracción “miRNeasy MiniKit” (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Durante la realización del protocolo, primero se añadió 140 µl de cloroformo, se agitó durante 15 s y se centrifugó a 14.000 rpm, durante 15 min, a 4 °C. Se obtuvieron 3 fases y la fase acuosa se retiró a una columna *Rneasy mini* y se añadió 525 µl de etanol 100%. Se centrifugó a 14.000 rpm, durante 30 s, a temperatura de ambiente. Se hicieron varios

lavados añadiendo 700 µl de Buffer RWT y se centrifugó a máxima velocidad, durante 30 s. Por último, se añadió 500 µl de Buffer RPE y se hizo una última centrifugación de 2 min para secar la membrana de la columna.

Se colocó la columna en un nuevo tubo de 1,5 ml y se eluyó el ARN en 30 µl de H₂O libre de nucleasas.

Posteriormente, se midió la concentración y la pureza del ARN a través del Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

4.2 Retrotranscripción

El ARN extraído del hígado fue diluido a una concentración de 5 ng/µl y se retrotranscribió 1 µg a ADNc, usando el kit de síntesis Universal cDNA Synthesis II (Exiqon, Dinamarca), en un volumen final de 10 µl. Esta retrotranscripción está basada en la unión de un adaptador poly-T.

La retrotranscripción fue realizada a 25 °C durante 5 min, 42 °C durante 30 min y 85 °C durante 5 min.

4.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) (SYBR Green® Assay)

Para analizar la expresión de los miARNs, en animales WT y deficientes en PASK, a partir del ADNc se llevó a cabo una RT-PCR, utilizando la master mix SYBR GREEN (Bio-Rad, California, USA), oligonucleótidos específicos para cada miARN (*LNA*TM PCR primer set, (Exiqon, Dinamarca)) y una placa de 96 pocillos (Bio-Rad, California, USA). Estos oligonucleótidos son especificados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (SYBR GREEN® Assay)

miR	Secuencia diana
<i>hsa-miR-33a-3p</i>	5'-CAAUGUUUCCACAGUGCAUCAC-3'
<i>hsa-miR-143-3p</i>	5'-UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC-3'

El ADNc fue diluido 1:80 en un volumen final de 10 µl. La PCR fue realizada en un termociclador CFX96 (Bio-Rad, California, USA). El programa estaba basado en: 1 ciclo a 95 °C de 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 10 s y 60 °C durante 1 min.

Los resultados fueron analizados por la ecuación de la variación de Ct y normalizados por el ARN ribosómico 5S.

5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS, SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

El análisis de la expresión y actividad de proteínas se llevó a cabo mediante Western Blot. Una pieza del hígado congelado (~100 mg) fue lisada a en buffer RIPA (PBS, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato Sódico, PMSF 1 mM, leupeptina 10 mg/ml, Na₂VO₄ 1 mM, Na₄P₂O₇ 2,5 mM, NaF 10 mM e inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). Una vez añadido el buffer, las muestras se expusieron a una irradiación en el microondas durante 5 s [152], después se homogenizaron, se sonicaron, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min para eliminar restos insolubles y se extrajo el sobrenadante. Todo ello se realizó a una temperatura de 4° C. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y medida en el lector SkanIt RE for Varioskan 2.2.1 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), mediante extrapolación en una recta construida con concentraciones conocidas de la proteína albúmina bovina de suero (BSA, 32µg/µl).

Para analizar la expresión de proteínas nucleares y citoplasmáticas, fracciones de estas proteínas fueron extraídas de fragmentos de hígado (~50-80 mg) mediante la

utilización NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

A las muestras se le añadió el volumen correspondiente de buffer de carga 5x (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerina al 20%, SDS al 4%, Azul de bromofenol al 0,05% y β -mercaptoetanol al 4%) y se hirvieron 5 min a 92 °C. 20-40 μ g de proteínas fueron cargados en un gel SDS-PAGE al 10% y la electroforesis se llevó a cabo con un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS al 0,01%) a 120 V. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Immum-Blot@PVDF, (Bio-Rad, California, USA)) mediante el sistema de transferencia en semiseco Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, California, USA), utilizando el tampón de transferencia comercial de Bio-Rad (California, USA). La transferencia se realizó durante 30 min a 25 V.

Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante 2 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo que contenía TBS-T pH 7,6 (NaCl 140 mM, Tris 2 mM, Tween 20 al 0,1%) y leche desnatada al 5%. A continuación, las formas totales y fosforiladas de las proteínas fueron detectadas con sus anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 8**) en una solución de bloqueo a una dilución apropiada durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, tras 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente unido a la peroxidasa de rábano (HRP), diluido en la solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron otros 3 lavados de 10 min con TBS-T. El revelado fue llevado a cabo mediante el reactivo ECL (Bio-Rad, California, USA), las bandas se visualizaron mediante quimioluminiscencia en películas fotográficas (Medical Film, Konica Minoca) y su intensidad se cuantificó mediante el software Quantity One (Bio-Rad, GS800 Densitometer). El peso molecular de las proteínas

Materiales y métodos

fue detectado utilizando marcadores de peso molecular conocido (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Se utilizó la proteína total detectada con la tecnología de STAIN FREE STAINING (Bio-Rad, California, USA) como control de carga [153] (**Figura Suplementaria 1**), por activación de las membranas con luz ultravioleta durante 2 min usando el Bio-Rad Chemidoc XRS Systems.

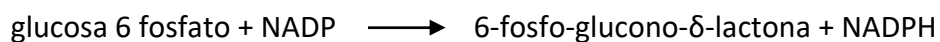
Tabla 8. ANTICUERPOS Y CONDICIONES USADAS PARA ENSAYOS DE WESTERN BLOT

Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Casa Comercial	Dilución
Anti-GCK	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	1:1000
Anti-GCKR	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	1:1000
Anti-Akt	Rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-fosfo Akt/PKB (Ser 473)	Mouse	Milipore Iberica, Madrid, España	1:1000
Anti-PTEN	Rabbit	Milipore Iberica, Madrid, España	1:500
Anti-PEPCK	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	1:1000
Anti-PGC1 α	Rabbit	Milipore Iberica, Madrid, España	1:1000
Anti-SREBP1c	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, California, USA	1:1000
Anti-Rabbit-HRP	Goat	Milipore Iberica, Madrid, España	1:5000
Anti-Mouse-HRP	Goat	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA	1:5000

6 ACTIVIDAD GLUCOQUINASA

Para determinar la actividad enzimática de la glucoquinasa, pequeños fragmentos de hígado (~100 mg) se lisaron en buffer de homogenización (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 1 mM EDTA (pH 7,4) suplementado con 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 10 μ M Leupeptina), y a continuación las muestras se sonicaron y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante resultante fue utilizado para medir actividad enzimática.

La actividad glucoquinasa se midió valorando, mediante fluorimetría, la cantidad de NADP⁺ reducido a NADPH en la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH):



La medida de la actividad glucoquinasa se valoró a dos concentraciones de sustrato:

a) a glucosa 0,3 mM, que es cuando la glucoquinasa es esencialmente inactiva y por tanto la fosforilación de la glucosa es debida a la hexoquinasa; y b) a glucosa 30 mM, que es cuando ocurren todas las actividades fosfotransferasas. La diferencia entre ambas actividades representa la actividad debida a la glucoquinasa.

Primeramente, para determinar la concentración de proteínas del extracto de tejido se utilizó el método de Lowry, medida en el lector SkanIt RE for Varioskan 2.2.1 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) mediante extrapolación en una recta construida con concentraciones conocidas de la proteína BSA. A continuación, la reacción se inició añadiendo 40 µg del extracto de tejido a un volumen final de 200 µl de la mezcla de reacción que contiene: 1 M Tris-HCl (pH 7,4), 1 M KCl, BSA 0,1%, 500 mM MgCl₂, 0,7 M β-mercaptoetanol, 100 mM ATP-MgCl₂, 50 mM NADP⁺ y 5,5 unidades de G6P-DH de *Leuconostoc mesenteroides*. La producción de NADPH se detectó midiendo la fluorescencia a intervalos de 5 min durante 30 min de reacción en el espectrofotómetro SkanIt RE for Varioskan 2.2.1 a un excitación y emisión de 340 y 460 nm respectivamente y los resultados se expresaron en pmoles de NADPH/min*µg proteína por extrapolación utilizando una recta patrón construida con diluciones conocidas de NADPH.

7 LOCALIZACIÓN NUCLEO/CITOPLASMA DE LA GLUCOQUINASA (GCK).

Para analizar la distribución subcelular de la GCK se realizaron inmunohistoquímicas en cortes de hígado de 20 µm de grosor realizados con el criostato (LEICA CM 1510 CS, Leyca Biosystems). Estos cortes de hígado, primero fueron fijados durante 20 min a 4 °C con paraformaldehído al 4% y tras tres lavados con PBS durante 10 min a temperatura

Materiales y métodos

ambiente, se permeabilizaron con PBS 0,4% tritón X-100 durante 40 min a temperatura ambiente. El bloqueo, de los sitios de unión de anticuerpos no específicos, se llevó a cabo durante una 1 h con una solución de bloqueo (PBS, 10% de FBS, 0,1% de tritón X-100) a temperatura ambiente.

Los cortes se incubaron con anticuerpo primario anti-GCK (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) en una dilución 1:100 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, tras los 3 lavados de 10 min cada uno con PBS a temperatura ambiente para eliminar el exceso de anticuerpo, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario, goat anti-rabbit-alexa 488 (GeneTex, Inc., San Antonio, CA, USA) diluido 1:200 en solución de bloqueo, para la detención de la fluorescencia. Por último, se volvieron hacer otros 3 lavados de 10 min, uno de ellos con 1 µg/ml de 4,6-diaminidina-2fenilindol (DAPI) en PBS (1:1000) para teñir el DNA en los núcleos.

Finalmente, el tejido fue montado con Fluoromount-G (EMS, Hatfield, PA, USA) en portaobjetos. Para observar la distribución de la fluorescencia, las imágenes fueron tomadas con un sistema de microscopía láser confocal TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con un microscopio Leica invertido DMIRE2, utilizando un objetivo HCX PL APO 63x/1.4-0.6 Oil Lbd BI de inmersión en aceite, en el centro de Citometría y Microscopia de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid. Las imágenes de fluorescencia confocal fueron analizadas usando el software LCS Lite de Leica y el programa Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

8 VISUALIZACIÓN DE ESTRUCTURAS SUBCELULARES

Para determinar si la dieta alta en grasa altera las estructuras subcelulares en ratones WT y deficientes en PASK, se llevó a cabo la preparación de muestras para su observación en el microscopio electrónico.

Primero, se realizó la fijación de secciones de hígado de 2 mm con un fijador (4% de paraformaldehído purificado y 2,5% de glutaraldehído) en tampón fosfato (2,26% NaH_2PO_4 y 2,52% de NaOH) a 4 °C durante 4-5 h. Posteriormente, se realizaron 3 o 4 lavados con el tampón fosfato durante 10 min y se dejó en dicho tampón toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se realizó una segunda fijación con tetraóxido de osmio 1% en agua bidestilada durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con agua bidestilada.

Seguidamente, se realizó una deshidratación en concentraciones crecientes de acetona (30%-100%) durante 15 min en cada concentración, para posteriormente llevar a cabo una infiltración en concentraciones crecientes de una mezcla de resina Spurr(Sigma)-acetona (1:3 durante una 1 h, 1:1 durante 1 h y 3:1 durante 2 h), y finalmente se mantuvo en resina pura toda la noche.

Por último, se hicieron bloques y se polimerizaron en una estufa a 65 °C durante 48 h. Se realizaron cortes de estos bloques para su posterior visualización en el microscopio electrónico JEOL JEM 1010 del Centro de Citometría y Microscopia de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

Los resultados fueron expresados como el número de mitocondrias por hepatocito/cm².

9 TINCIÓN OIL RED

Para determinar el contenido lipídico del hígado de ratones WT y *Pask*^{-/-} y ver las diferencias entre los alimentados con SFD y HFD, se realizó una tinción con el colorante “Oil Red”. Este colorante es utilizado para teñir lípidos en secciones de tejidos.

Se hicieron cortes de hígado de 15 a 20 μm de grosor. Los cortes fueron fijados con formalina diluida en un buffer neutro (Formalina (37%), NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4) durante 10-15 min y posteriormente se hizo un lavado con agua y después con isopropanol al 60%. A continuación, se realizó la tinción de los lípidos con “Oil Red” diluido en isopropanol durante 15 min y se volvió a lavar con isopropanol al 60% y finalmente con agua destilada para eliminar el exceso.

Por último, se llevó a cabo la visualización de los cortes en el microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara Nikon DXM 1200F.

10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores fueron presentados como medias \pm SEM. La comparación entre las medias de 2 grupos diferentes se realizó mediante la prueba T-test, que se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal y tiene un tamaño muestral pequeño. Para ello se empleó el programa estadístico Graphad Quickcals: t test calculator. $P \leq 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Las diferencias entre los distintos tratamientos fueron analizadas mediante el Análisis de la varianza (ANOVA), seguido por el test de Tukey de comparaciones múltiples.

1 CARACTERIZACIÓN DE RATONES DEFICIENTES EN PASK ($Pask^{-/-}$)

Los ratones $Pask^{-/-}$ fueron caracterizados mediante qRT-PCR para comprobar la carencia del dominio quinasa en estos ratones. Para ello se utilizó una pareja de cebadores que amplifica dentro de la región quinasa. Los ratones deficientes en PASK no presentaban amplificación de la región que codifica para el dominio quinasa de la proteína, a diferencia de los ratones WT (**Figura 14A**).

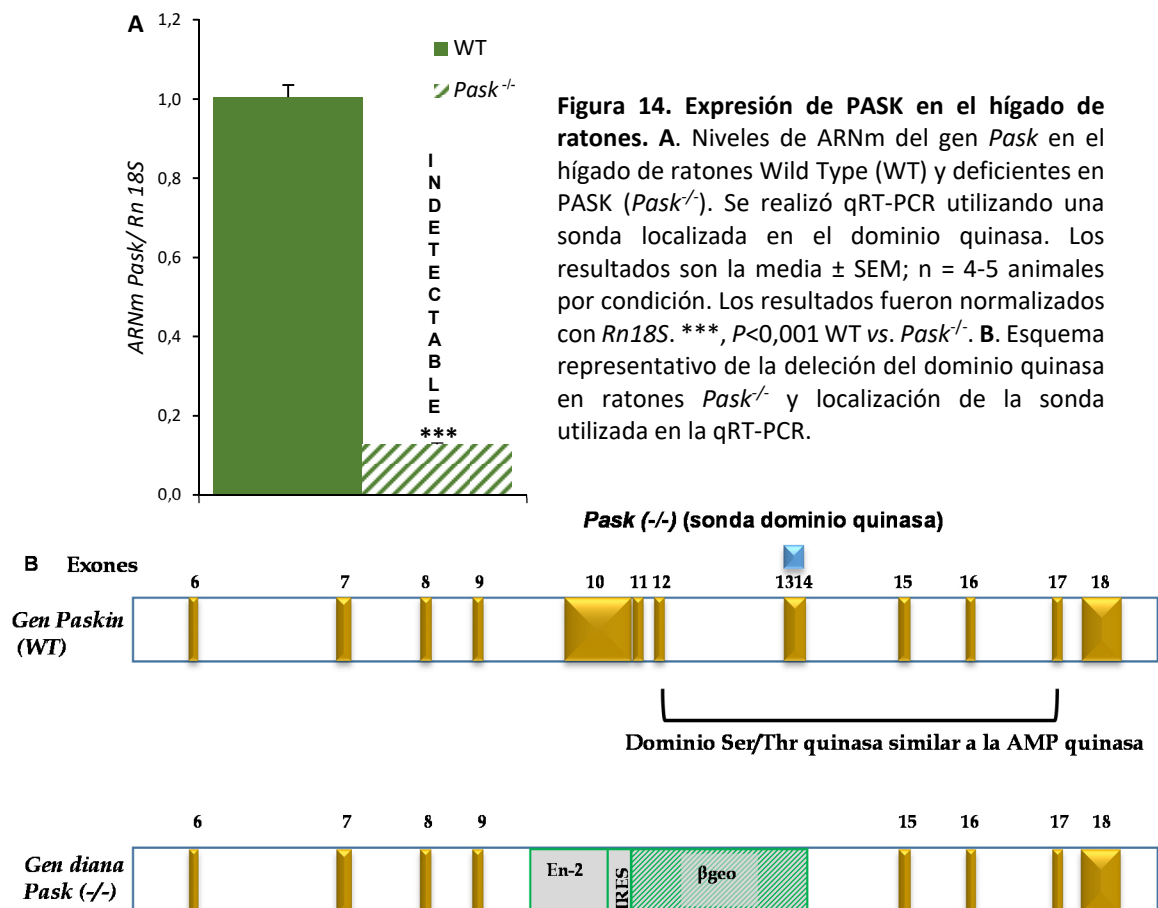


Figura 14. Expresión de PASK en el hígado de ratones. A. Niveles de ARNm del gen $Pask$ en el hígado de ratones Wild Type (WT) y deficientes en PASK ($Pask^{-/-}$). Se realizó qRT-PCR utilizando una sonda localizada en el dominio quinasa. Los resultados son la media \pm SEM; $n = 4-5$ animales por condición. Los resultados fueron normalizados con $Rn18S$. ***, $P < 0,001$ WT vs. $Pask^{-/-}$. B. Esquema representativo de la delección del dominio quinasa en ratones $Pask^{-/-}$ y localización de la sonda utilizada en la qRT-PCR.

2 RESPUESTA DE LA GLUCOQUINASA HEPÁTICA Y SU PROTEÍNA REGULADORA A CONDICIONES DE AYUNO Y ALIMENTACIÓN. EFECTO DE LA EXENDINA-4 (Ex4)

La glucoquinasa (GCK) es un enzima que actúa como sensor de glucosa y tiene un papel muy importante en la regulación de su homeostasis. Presenta regulación a nivel transcripcional y postraducciona mediante interacción con su proteína reguladora (GCKR).

Dado que se ha identificado a PASK como un posible sensor metabólico en áreas hipotalámicas [107], quisimos ver como la deficiencia de PASK puede afectar en la regulación de esta enzima por ayuno/alimentación a nivel hepático.

2.1 Regulación de la expresión de la glucoquinasa y la proteína reguladora de la glucoquinasa por ayuno/alimentación

Para determinar su adaptación a los cambios nutricionales, los niveles de ARNm de los genes *Gck* y *Gckr* fueron medidos mediante qRT-PCR en el hígado de ratones WT en estado basal, ayunados 18 o 48 h o realimentados 3 h. Se observó que tanto la expresión de *Gck*, como de *Gckr* disminuyó durante ayunos cortos. Sin embargo, en ayunos prolongados (48 h) se produjo un aumento significativo de la expresión del gen de la proteína reguladora mientras que la expresión de *Gck* se mantuvo en el mismo nivel que en ayunos cortos (18 h) (**Figura 15**).

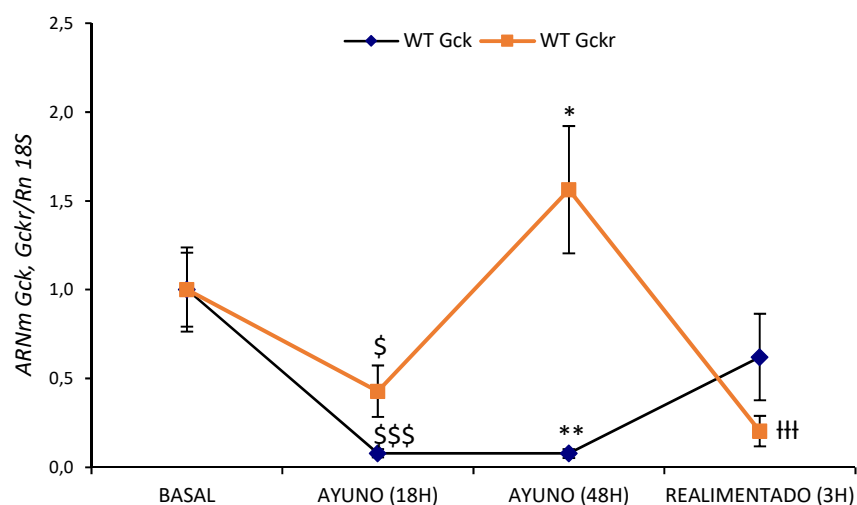


Figura 15. Regulación por ayuno/alimentación de los niveles de ARNm de *Gck* y *Gckr*.

Para medir los niveles de ARNm de los genes *Gck* y *Gckr* se realizó qRT-PCR. El ARNm fue medido en el hígado de ratones WT en estado basal, ayunados (18 o 48 h) o realimentados (3 h). Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición. Los resultados fueron normalizados con *Rn18S*. \$, $P<0,05$; \$\$\$, $P<0,001$ basal vs. ayuno (18 h); *, $P<0,05$; **, $P<0,01$ basal vs. ayuno (48 h); y †††, $P<0,001$ ayuno 48 h vs. realimentado (3h).

Posteriormente, se comparó la respuesta de los ratones WT y deficientes en PASK en condiciones basales (sin ayuno), ayuno (48 h) y realimentación (3 h). Los ratones deficientes en PASK presentaron una menor expresión de *Gck* y *Gckr* en condiciones basales con respecto a los controles. En ayunos prolongados, la expresión de *Gck* quedó bloqueada en ratones WT al contrario de lo que ocurrió con la proteína reguladora, sin embargo en ratones *Pask*^{-/-} ambos genes quedaron bloqueados en ayuno. Tras una realimentación de 3h, los ratones deficientes en PASK presentaron una recuperación más rápida tanto de *Gck* como de *Gckr*. La Ex4 bloqueó el efecto de la realimentación sobre la expresión de *Gck* y *Gckr* (Figura 16 A y B).

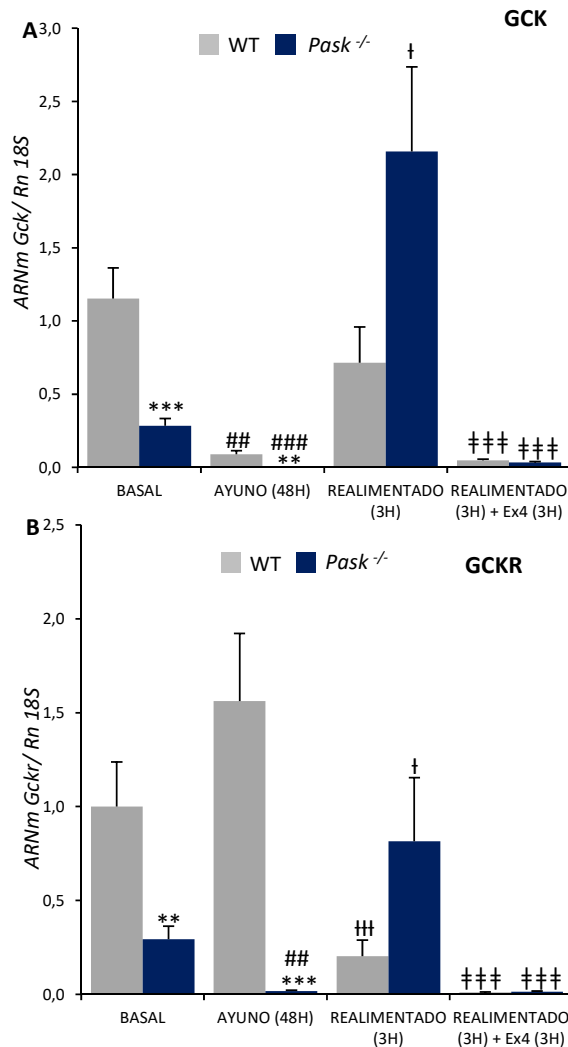


Figura 16. Efecto de la deficiencia de PASK sobre los niveles de expresión génica de *Gck* y *Gckr*. Los niveles de ARNm del hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) en estado basal, ayuno (48 h) y realimentados (3 h) en presencia o ausencia de Ex4 (3h) fueron medidos mediante qRT-PCR y normalizados con *Rn18S*. Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición. **A.** ARNm de *Gck*. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; ##, $P < 0,01$; ###, $P < 0,001$ basal vs. ayuno 48 h; †, $P < 0,05$ ayuno 48 h vs. realimentado (3 h); y †††, $P < 0,001$ realimentado (3 h) vs. realimentado (3 h) + Ex4 (3 h). **B.** ARNm de *Gckr*. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; ##, $P < 0,01$ basal vs. ayuno 48 h; †, $P < 0,05$; ††, $P < 0,001$ ayuno 48 h vs. realimentado (3 h); y †††, $P < 0,001$ realimentado (3 h) vs. realimentado (3 h) + Ex4 (3 h).

2.2 La expresión de las proteínas GCK y GCKR se encuentra alterada en ratones *Pask*^{-/-}

Los niveles de proteína GCK y GCKR fueron medidos mediante Western Blot utilizando hígado de ratones WT y deficientes en PASK en condiciones basales, ayunos de 48 h y realimentación de 3 h.

En ambos tipos de ratones, los niveles de proteína GCK disminuyeron durante ayunos prolongados y la realimentación no fue suficiente para que volviera a niveles basales. Los

niveles de GCK tienden a ser más bajos en ratones *Pask*^{-/-} en las tres condiciones analizadas (Figura 17), siendo significativo en condiciones basales.

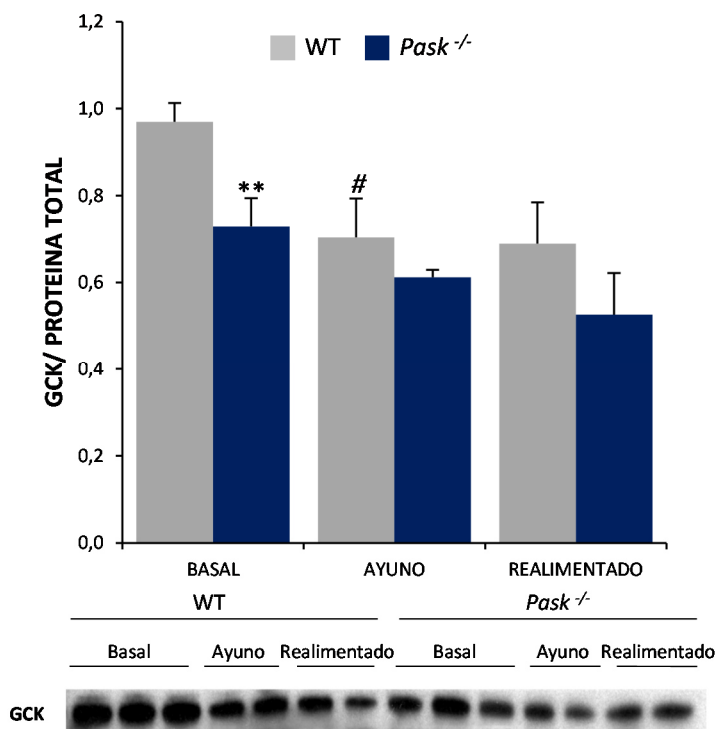


Figura 17. Respuesta de la GCK a ayuno/alimentación. Los niveles de proteína GCK se midieron mediante Western Blot utilizando lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) en estado basal, ayunados (48 h) o realimentados (3 h). Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición y fueron referidos a los ratones WT en estado basal. Los resultados fueron normalizados por cantidad total de proteína detectada por Stain Free (Figura suplementaria 1). Inmunoblot representativo de la GCK. **, $P < 0,01$ WT vs. *Pask*^{-/-}; y #, $P < 0,05$ basal vs. ayuno 48 h

Con respecto a la proteína GCKR, ratones WT presentaron una menor expresión en condiciones de ayuno que en condiciones basales, mientras que en ratones deficientes en PASK ocurre lo contrario. En condiciones basales, los niveles de GCKR fueron significativamente más bajos en ratones *Pask*^{-/-} con respecto a los WT, al igual que ocurría con la GCK. Tras la realimentación, la GCKR tiende a ser más elevada en ratones deficientes en PASK (Figura 18).

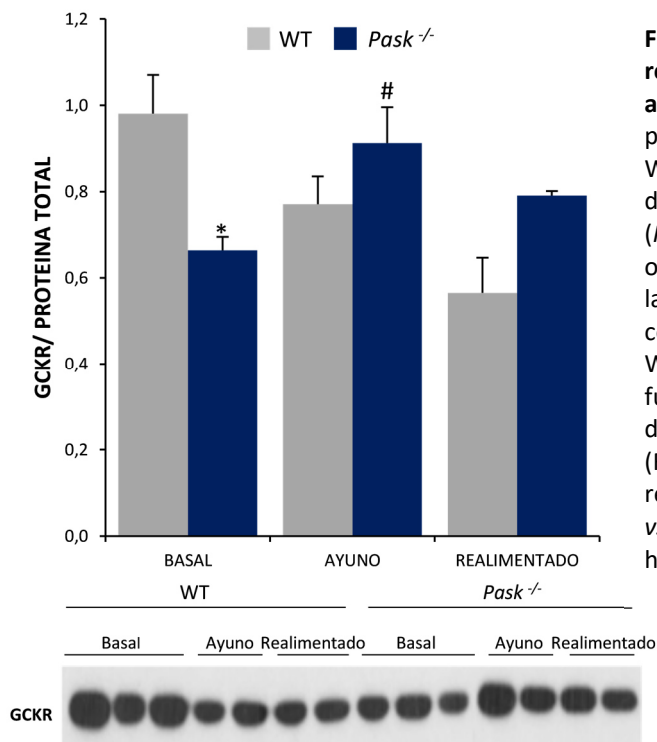


Figura 18. Respuesta de la proteína reguladora de la glucoquinasa (GSKR) a ayuno/alimentación. Los niveles de proteína GSKR se midieron mediante Western Blot utilizando lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) en estado basal, ayunados (48 h) o realimentados (3 h). Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición y fueron referidos a los ratones WT en estado basal. Los resultados fueron normalizados por cantidad total de proteína detectada por Stain Free (Figura suplementaria 1). Inmunoblot representativo de la GSKR. *, $P < 0,05$ WT vs. *Pask*^{-/-} y #, $P < 0,05$ basal vs. ayuno 48 h.

2.3 La acción de la Ex4 sobre la expresión de la GSK es dependiente de PASK

El efecto de la Ex4 en la adaptación a los cambios nutricionales de la GSK y GSKR hepáticas se midieron en ratones WT y deficientes en PASK tratados en presencia o ausencia de Ex4 (250 ng/ 100 g peso) durante 3 h en estado basal, ayuno de 48 h y realimentación de 3 h.

Se observó que, en ratones WT, la Ex4 disminuyó de forma significativa la expresión de la proteína GSK en condiciones basales. Por el contrario, en ratones *Pask*^{-/-} la Ex4 aumentó su expresión, y el efecto fue máximo en condiciones de ayuno (**Figura 19A**). Sin embargo, la Ex4 no modificó significativamente los niveles de GSKR (**Figura 19B**).

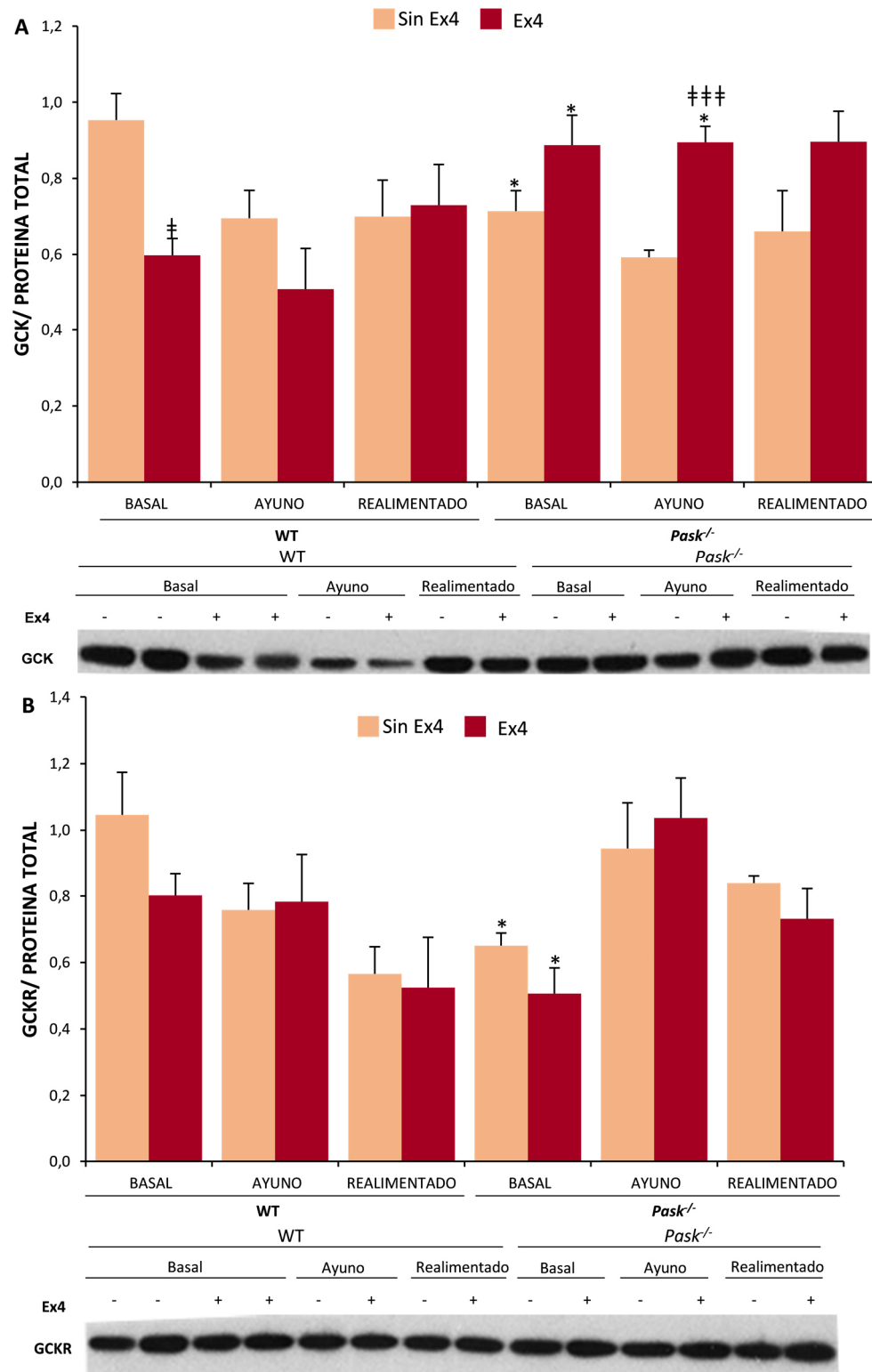


Figura 19. Efecto de la deficiencia de PASK en la acción de la Ex4 sobre la expresión de la proteína GCK y GCKR en condiciones de ayuno/alimentación. Los efectos de la Ex4 sobre la expresión de las proteínas GCK y GCKR se midieron mediante Western Blot utilizando lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) tratados previamente en presencia o ausencia de Ex4 (250 ng/100 g peso) que habían sido ayunados 48 h, realimentados 3 h o en estado basal. Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición y fueron referidos a los ratones WT en estado basal no tratados con Ex4. Estos resultados fueron normalizados por cantidad total de proteína detectada con Stain Free (Figura suplementaria 1). **A.** Inmunoblot representativo de la GCK; *, $P < 0,05$ WT vs. *Pask*^{-/-}; ‡, $P < 0,05$; †††, $P < 0,001$ sin Ex4 vs. Ex4. **B.** Inmunoblot representativo de la GCKR; *, $P < 0,05$ WT vs. *Pask*^{-/-}.

2.4 Regulación de la localización subcelular de la GCK por ayuno y alimentación

La actividad de la GCK es regulada también en estados de ayuno y alimentación mediante su interacción con la GCKR. Localizándose el complejo GCK-GCKR en el núcleo durante periodos de ayuno y la GCK libre en el citoplasma durante periodos postprandiales.

Para analizar su localización, se realizó una inmunohistoquímica en cortes de hígado de ratones WT y deficientes en PASK en estado basal o ayuno de 48 h. En estado basal/alimentación, los ratones WT presentaron, como era de esperar, una localización citoplasmática de la GCK, pero en ratones deficientes en PASK esta localización fue mayoritariamente nuclear como ocurría en condiciones de ayuno en ambos tipos de ratones (Figura 20).

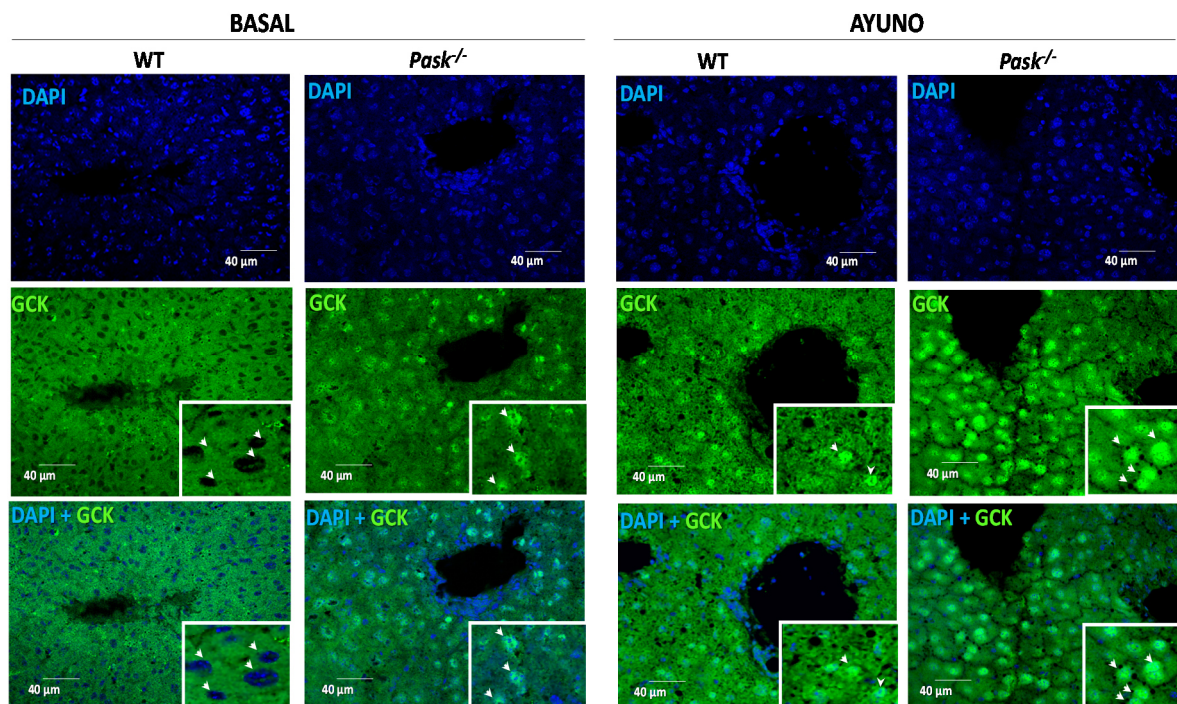


Figura 20. Efecto de la deficiencia de PASK en la regulación de la localización subcelular de la GCK por ayuno/alimentación. El análisis de la localización de la GCK se realizó mediante Inmunohistoquímica en cortes de hígados de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) en estado basal o en ayuno de 48 h. La localización subcelular de la GCK fue visualizada en verde (Alexa 488 acoplada a un anticuerpo secundario). Los recuadros muestran la magnificación de algunas áreas, para observar los detalles. El ADN de los núcleos fue teñido con DAPI (fluorescencia azul). Las flechas indican dónde se localiza el núcleo de los hepatocitos.

2.5 La actividad de la GCK hepática está alterada en ratones *Pask*^{-/-}

La actividad de la GCK se midió sustrayendo la actividad hexoquinasa medida a 0,3 mM glucosa de la actividad total medida a 30 mM glucosa en extractos de hígado de ratones WT y *Pask*^{-/-} en estado basal o realimentados 3 h después del ayuno (48 h). Algunos de estos ratones realimentados fueron tratados con Ex4.

Tanto en condiciones basales como de realimentación, los ratones deficientes en PASK presentaron menor actividad glucoquinasa que los ratones WT (**Figura 21A y B**). La recuperación de la actividad glucoquinasa, por realimentación después del ayuno, fue también más lenta en ratones *Pask*^{-/-}. La Ex4 disminuyó la actividad glucoquinasa de forma similar en ambos tipos de ratones (**Figura 21B**).

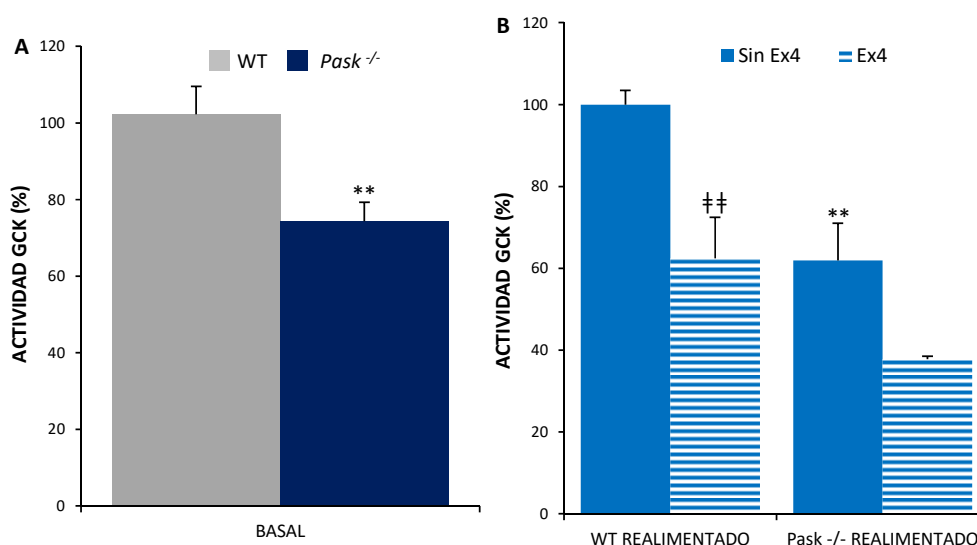


Figura 21. Efecto de la deficiencia de PASK sobre la actividad glucoquinasa. La actividad glucoquinasa (GCK) se midió como la diferencia de la actividad total determinada a 30mM glucosa y la actividad hexoquinasa (HK) a 0,3 mM glucosa. **A.** Para estos ensayos se utilizaron extractos de hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) en estado basal. La actividad GCK es dada como la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición y es representado como porcentaje del valor del ratón WT utilizado como control. **, $P < 0,01$ WT vs. *Pask*^{-/-}. **B.** En este caso los ratones habían sido realimentados 3 h tras un ayuno prolongado (48 h) y algunos de ellos fueron tratados con Exendina-4 (Ex4). **, $P < 0,01$ WT vs. *Pask*^{-/-}; y ††, $P < 0,01$ sin Ex4 vs. Ex4.

Resultados

Analizamos también la contribución de la actividad glucoquinasa o hexoquinasa en ratones WT y deficientes en PASK en presencia o ausencia de Ex4. La actividad GK contribuyó en un ~70% a la actividad total, pero no se observaron diferencias entre ambos tipos de ratones ni en los tratamientos con Ex4 (**Figura 22**).

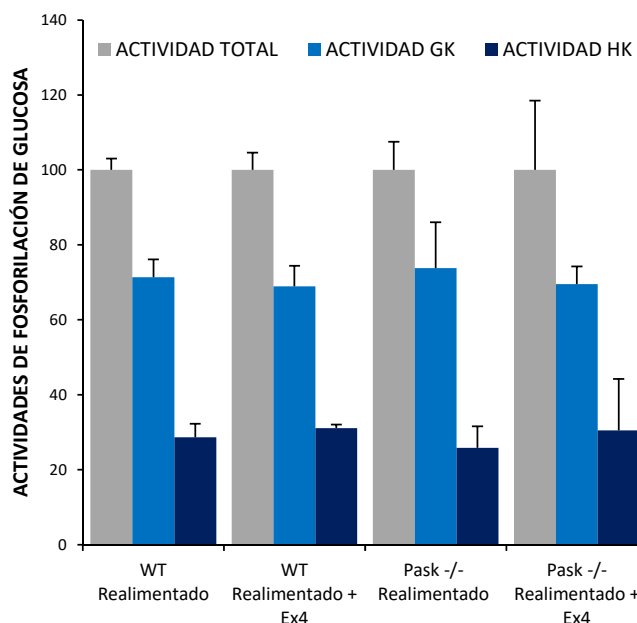


Figura 22. Efecto de la deficiencia de PASK sobre las actividades de fosforilación de glucosa.

Se utilizaron extractos de hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) que habían sido realimentados 3 h tras un ayuno prolongado (48 h) y algunos de ellos fueron tratados con Ex4. La actividad GCK y la actividad HK son dadas como el porcentaje \pm SEM del total de actividad fosforilante de glucosa en ratones realimentados que se han considerado como 100% tanto en presencia o como en ausencia de Exendina-4 (Ex4).

3 REGULACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y ENZIMAS DE LAS PRINCIPALES VÍAS METABÓLICAS HEPÁTICAS EN RESPUESTA A ESTADOS DE AYUNO/ALIMENTACIÓN

Los cambios de los niveles circulantes de glucosa y hormonales que se producen en condiciones de ayuno o alimentación desencadenan la expresión de factores de transcripción y enzimas claves para regular las principales rutas metabólicas hepáticas.

3.1 La deficiencia de PASK alteró la regulación de la expresión de diferentes genes hepáticos por ayuno/alimentación

Los niveles de expresión de ARNm de genes hepáticos se midieron mediante qRT-PCR, utilizando el hígado de ratones WT y deficientes en PASK en condiciones de ayuno de 48 h, realimentados posteriormente 3 h y en estado basal.

Analizamos la expresión de factores de transcripción que regulan a su vez las enzimas claves de la gluconeogénesis, glucolisis y de la síntesis y degradación de ácidos grasos.

En ratones WT, el ayuno aumentó la expresión de los factores de transcripción: *Pgc1α*, *Foxo1*, *Ppara* y *Pparγ* y del regulador *Sirt2* que regulan las enzimas *G6Pasa* y *Pepck* de la gluconeogénesis y la *Cpt1α* y *M-cad* que activan el transporte y oxidación de ácidos grasos. Los ratones deficientes en PASK en condiciones de ayuno presentaron una menor expresión de *Foxo1*, *Cpt1α* y *G6Pasa*, y mayor expresión de *Ppara* y *Pparγ* con respecto a WT. En el caso de la *Cpt1α*, la expresión disminuye significativamente pudiendo afectar a la entrada de ácidos grasos a la mitocondria (**Figura 23**).

En ratones WT, la alimentación de 3 h después de ayunos prolongados fue suficiente para activar la expresión de factores de transcripción como el *Srebp1c* y las enzimas *Acc* y *Fas*, pero en otros casos el incremento de expresión sólo fue significativo tras periodos más largos (estado basal) como: *Lxra*, *Chrebp*, *L-pk* y *Scd1*. Nuestros resultados confirmaron que la realimentación bloquea la expresión de todos los genes estimulados por ayuno (*Foxo1*, *Ppara*, *Pepck*, *G6Pasa*, *Cpt1α*, *Sirt2*), inhibiendo la gluconeogenesis y el transporte de ácidos grasos a la mitocondria. Mientras que inducen a la *Gck* (**Figura 15**) y genes que participan en la síntesis de ácidos grasos, estimulando la glucolisis y lipogénesis *de novo*. En ratones *Pask*^{-/-}, la alimentación no activó la expresión de *Acc* y *Fas* manteniendo inactiva la lipogénesis *de novo*, sin embargo si produjo un aumento significativo en los niveles de

Resultados

expresión de *Lxra* y *Srebp1c* con respecto a los ratones WT. En los ratones deficientes en PASK también se observó en estado basal un incremento de la expresión de: *Foxo1*, *Lxra*, *Pparγ*, *Srebp1c*, *Acc*, *L-pk*, *Pepck* y *Scd1* (Figura 23 y 24).

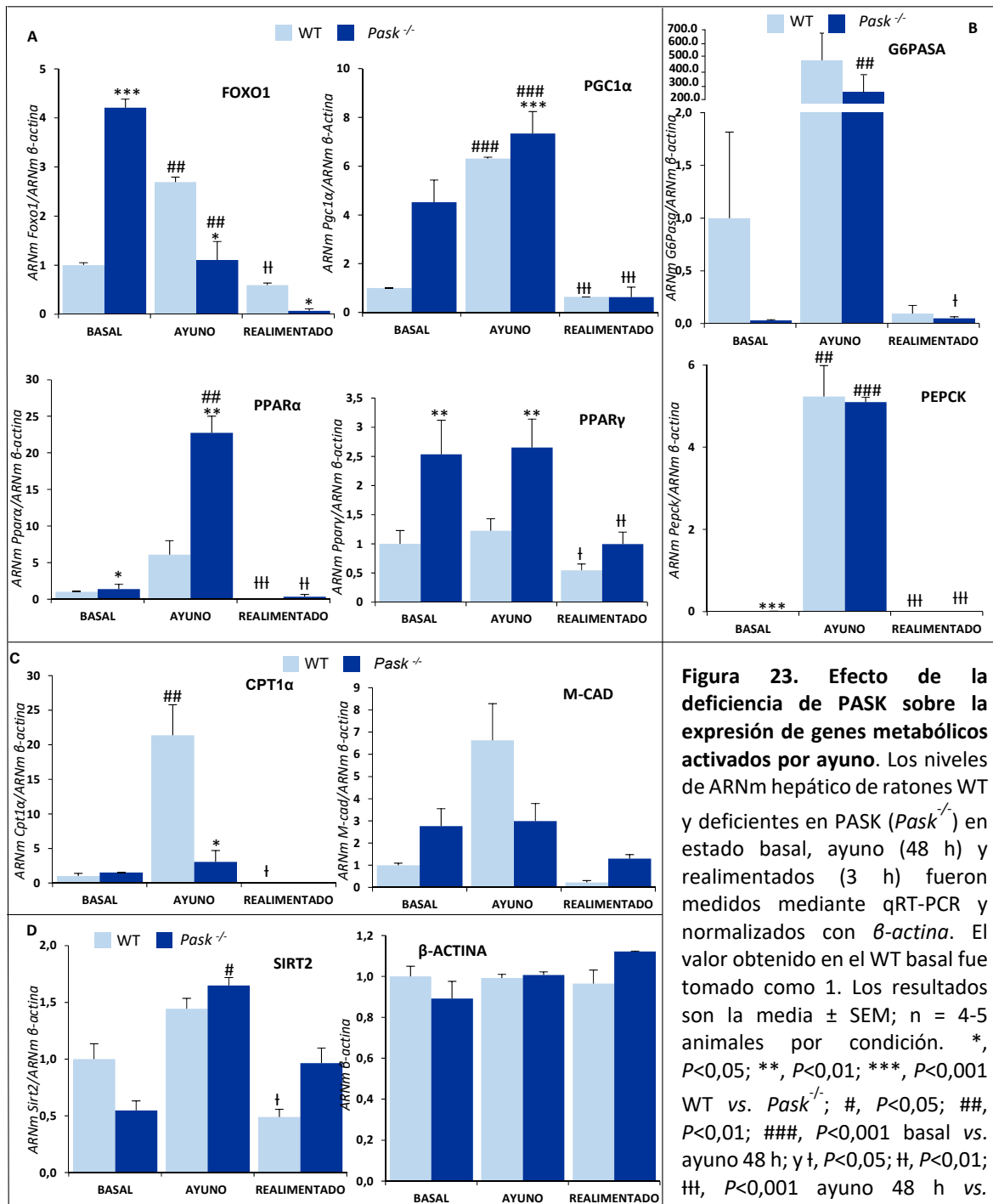


Figura 23. Efecto de la deficiencia de PASK sobre la expresión de genes metabólicos activados por ayuno. Los niveles de ARNm hepático de ratones WT y deficientes en PASK ($Pask^{-/-}$) en estado basal, ayuno (48 h) y realimentados (3 h) fueron medidos mediante qRT-PCR y normalizados con β -actina. El valor obtenido en el WT basal fue tomado como 1. Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. $Pask^{-/-}$; #, $P < 0,05$; ##, $P < 0,01$; ###, $P < 0,001$ basal vs. ayuno 48 h; y †, $P < 0,05$; ‡, $P < 0,01$; ††, $P < 0,001$ ayuno 48 h vs. realimentado.

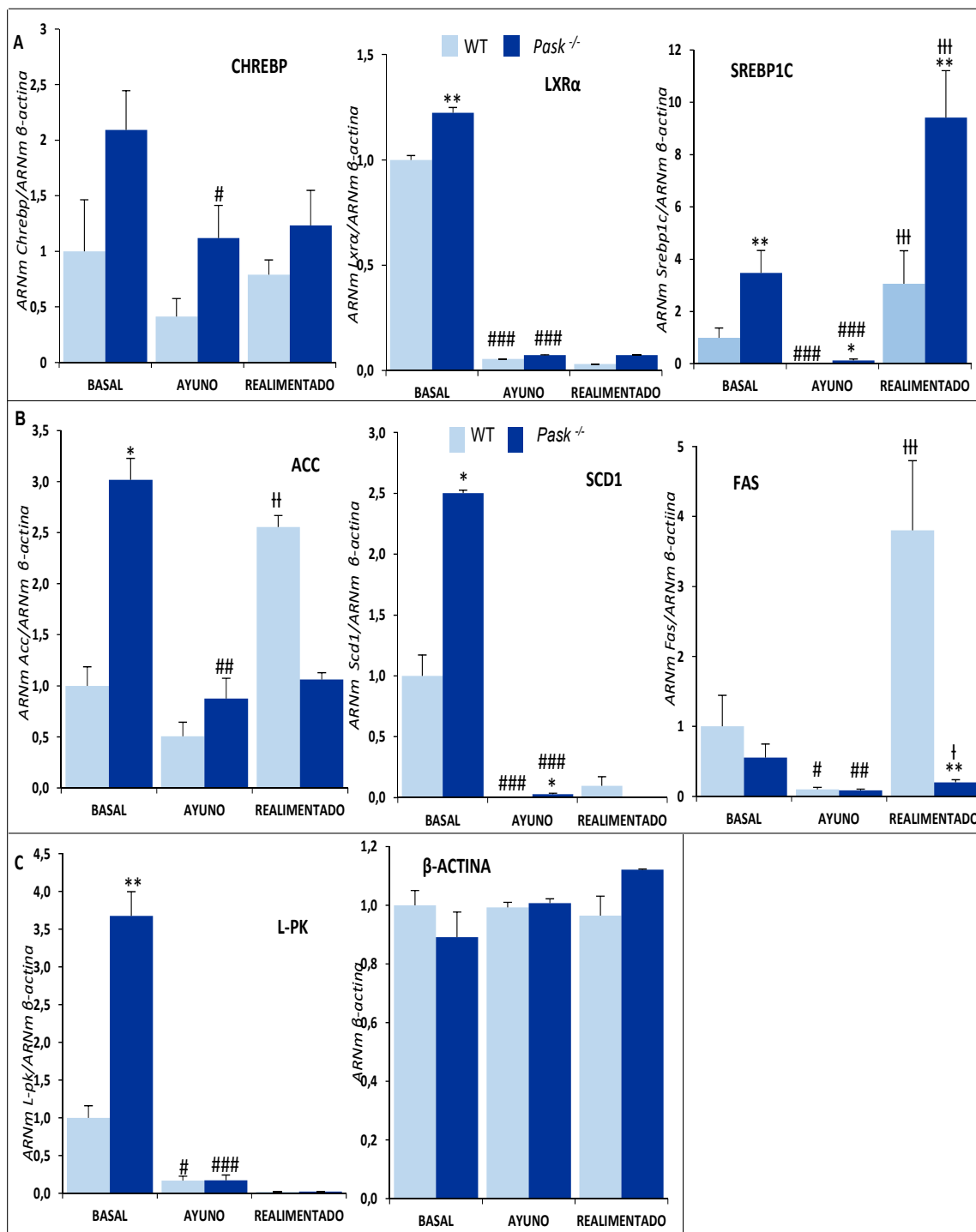


Figura 24. Efecto de la deficiencia de PASK sobre la expresión de genes metabólicos activados por alimentación. Los niveles de ARNm hepático de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) en estado basal, ayuno (48 h) y realimentados (3 h) fueron medidos mediante qRT-PCR y normalizados con *β-actina*. El valor obtenido en el WT basal fue tomado como 1. Los resultados son la media ± SEM; n = 4-5 animales por condición. *, *P*<0,05; **, *P*<0,01; WT vs. *Pask*^{-/-}; #, *P*<0,05; ##, *P*<0,01; ###, *P*<0,001 basal vs. ayuno 48 h; y †, *P*<0,05; ‡, *P*<0,001 ayuno 48 h vs. realimentado.

3.2 La deficiencia de PASK modificó la adaptación de las proteínas PGC1 α y PEPCCK a ayuno/alimentación

Los niveles de proteína del PGC1 α , coactivador que regula la ruta de la gluconeogénesis y de la PEPCCK, una de las enzimas de la gluconeogénesis, fueron analizados también mediante Western Blot utilizando lisados de hígado de ratones WT y deficientes en PASK en condiciones basales, ayuno de 48 h y realimentación de 3 h.

La expresión más elevada de PGC1 α se produjo en ayuno en ambos tipos de ratones y el efecto de la alimentación solo se observó en condiciones basales, además su expresión en ratones *Pask*^{-/-} en condiciones basales, fue significativamente mayor que en ratones WT (Figura 25).

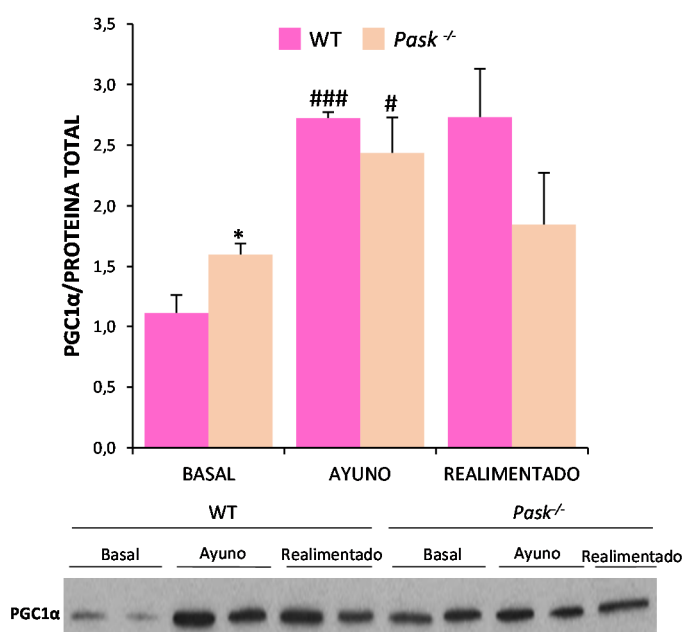


Figura 25. Efecto de la deficiencia de PASK en los niveles de expresión de la proteína PGC1 α . Los niveles de expresión de la proteína PGC1 α se midieron mediante Western Blot utilizando lisados del hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) que habían sido ayunados 48 h, realimentados 3 h o en estado basal. Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición y fueron referidos a los ratones WT en estado basal. Estos resultados fueron normalizados por cantidad total de proteína detectada con Stain Free (Figura suplementaria 1). Inmunoblot representativo de PGC1 α ; *, $P < 0,05$ WT vs. *Pask*^{-/-}; y #, $P < 0,05$; ###, $P < 0,001$ basal vs. ayuno 48 h.

Asimismo, la cantidad de PEPCCK aumentó en ayuno en ambos tipos de ratones y la realimentación de 3 h fue suficiente para alcanzar los niveles del estado basal en ratones WT, mientras que en ratones *Pask*^{-/-} alimentaciones cortas no fueron suficientes para

recuperar el nivel del estado basal. Sin embargo, la expresión de PEPCK fue menor en los ratones *Pask*^{-/-} en condiciones basales (**Figura 26**).

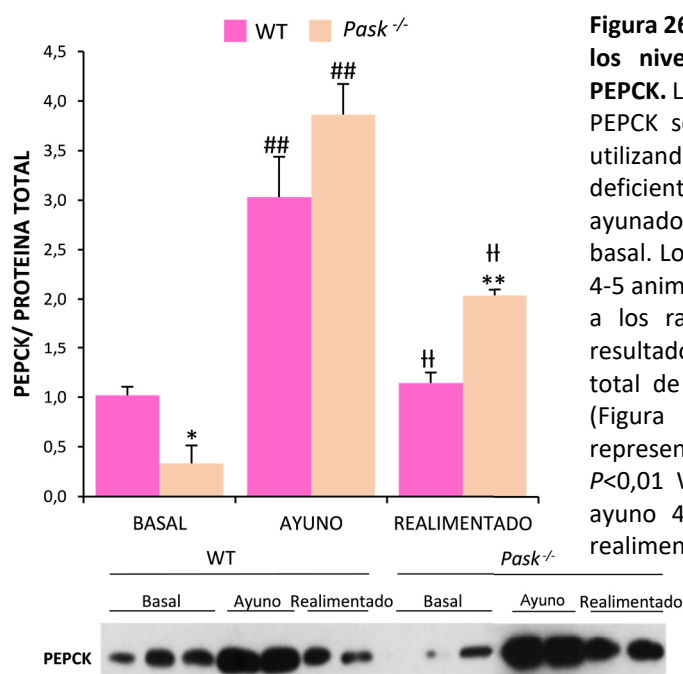


Figura 26. Efecto de la deficiencia de PASK en los niveles de expresión de la proteína PEPCK. Los niveles de expresión de la proteína PEPCK se midieron mediante Western Blot utilizando lisados del hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) que habían sido ayunados 48 h, realimentados 3 h o en estado basal. Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición y fueron referidos a los ratones WT en estado basal. Estos resultados fueron normalizados por cantidad total de proteína detectada con Stain Free (Figura suplementaria 1. Inmunoblot representativo de PEPCK; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ WT vs. *Pask*^{-/-}; ##, $P < 0,01$ basal vs. ayuno 48 h; y †, $P < 0,01$ ayuno 48 h vs. realimentado 3 h.

3.3 La deficiencia de PASK alteró la ruta de señalización de la insulina en respuesta a ayuno/alimentación

La Akt es uno de los principales componentes de la ruta de la insulina y es fosforilada y activada en estados postprandiales. La actividad de esta vía también es regulada por la fosfatasa PTEN. Los niveles de expresión y activación de la Akt se midieron mediante Western Blot en hígado de ratones WT y deficientes en PASK en estado basal, ayuno de 48 h o realimentación (3 h).

Los niveles de Akt fueron similares en ambos tipos de ratones (**Figura 27A**). La forma activada se midió como P-Akt (Ser-473). En ratones *Pask*^{-/-}, la proteína fosforilada (activa) presentó mayores niveles de expresión que en ratones WT. El ayuno bloqueó su activación

Resultados

en los ratones WT, mientras que en ratones *Pask*^{-/-} se mantuvo activa en todas las condiciones analizadas (Figura 27B).

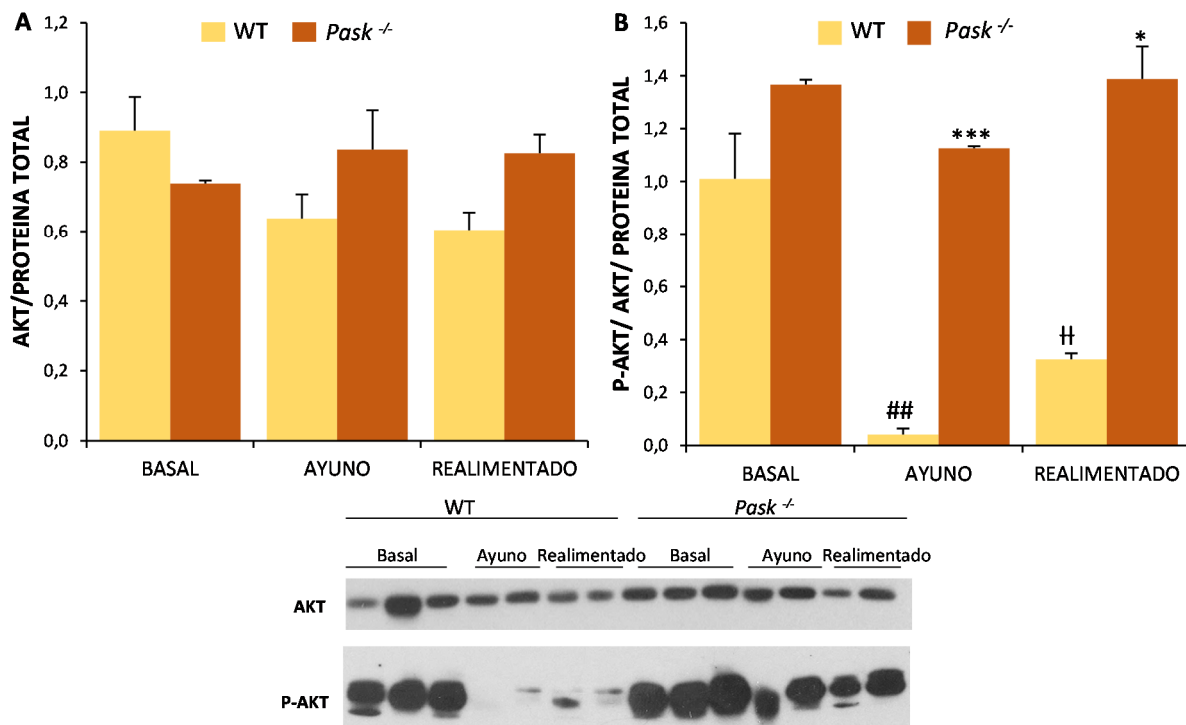


Figura 27. Efecto de la deficiencia de PASK sobre la ruta de la insulina. Los niveles de expresión de la proteína Akt (total) y P-Akt (Ser-473) se midieron mediante Western Blot utilizando lisados del hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) que habían sido ayunados 48 h, realimentados durante 3 h o en estado basal. Los resultados son la media ± SEM; n = 4-5 animales por condición y fueron referidos a los ratones WT en estado basal. Estos resultados fueron normalizados por proteína total detectada con Stain Free (Figura suplementaria 1). **A y B.** Inmunoblots representativos de Akt y P-Akt; *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; ##, $P < 0,01$ basal vs. ayuno 48 h; y ††, $P < 0,01$ ayuno 48 h vs. realimentado.

La fosfatasa PTEN es un supresor tumoral que actúa como regulador de esta vía, desfosforilando intermediarios e inactivándola. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre ratones WT y deficientes en PASK. Ambos tipos de ratones, presentaron una expresión significativamente menor de esta proteína en ayuno con

respecto a condiciones basales (**Figura 28**), recuperándose ligeramente tras la realimentación.

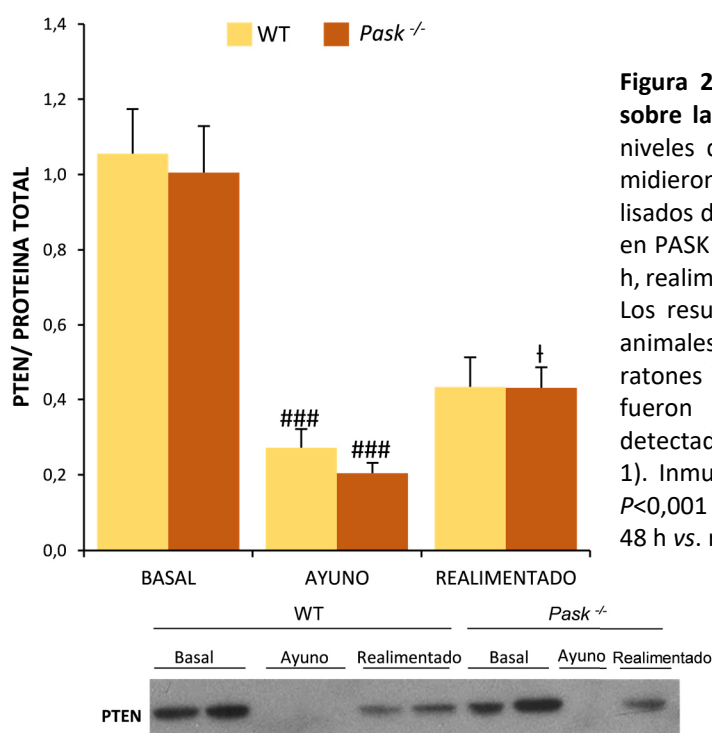


Figura 28. Efecto de la deficiencia de PASK sobre la expresión de la proteína PTEN. Los niveles de expresión de la proteína PTEN se midieron mediante Western Blot utilizando lisados del hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) que habían sido ayunados 48 h, realimentados durante 3 h o en estado basal. Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición y fueron referidos a los ratones WT en estado basal. Estos resultados fueron normalizados por proteína total detectada con Stain Free (Figura suplementaria 1). Inmunoblot representativo de PTEN; ###, $P < 0,001$ basal vs. ayuno 48 h; y †, $P < 0,05$ ayuno 48 h vs. realimentado.

3.4 Alteración de la maduración de SREBP1 en ratones *Pask*^{-/-}

El SREBP1 es un factor de transcripción que regula la homeostasis lipídica. Se sintetiza como precursor y es procesado por proteólisis a su forma madura que es translocada al núcleo. La proteólisis y activación está favorecida por la insulina.

Se realizaron Western Blot de lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK en estado basal, ayunos de 48 h y realimentación de 3 h para medir los niveles del precursor y la forma madura del SREBP1.

Los niveles del precursor se midieron utilizando la fracción citoplasmática. Estos niveles aumentaron ligeramente en condiciones de alimentación tanto en ratones WT como *Pask*^{-/-} (**Figura 29A**).

Resultados

Para analizar la expresión de la forma madura se utilizaron extractos nucleares. En ratones WT, los niveles más altos se encontraron en estado basal y realimentación disminuyendo en ayuno. Sin embargo, los ratones deficientes en PASK presentaron menor nivel de expresión de la forma nuclear activa tras la realimentación (**Figura 29B**).

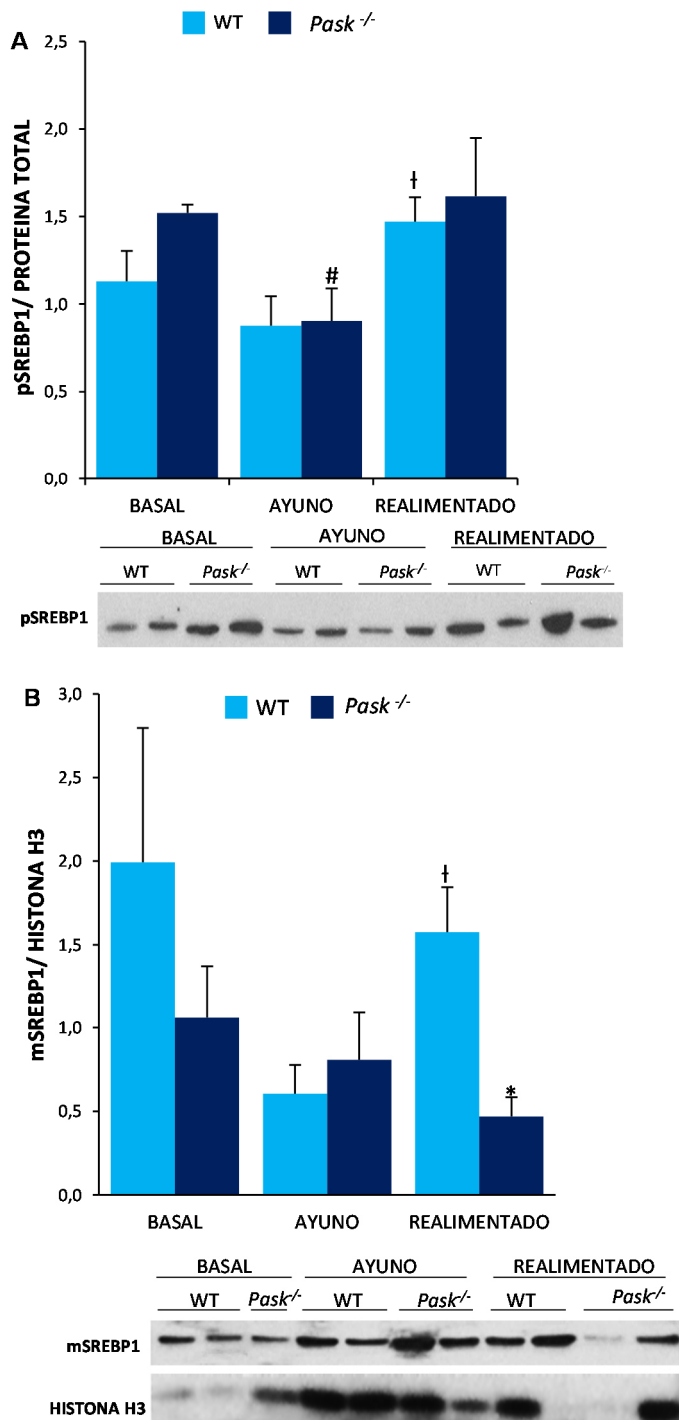


Figura 29. Efecto de la deficiencia de PASK sobre la maduración del SREBP1. Los niveles del precursor (pSREBP1) y la forma madura (mSREBP1) de SREBP1 fueron medidos utilizando la fracción citoplasmática y nuclear, respectivamente, del hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) en estado basal, ayuno (48 h) y realimentación (3 h). Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición y fueron referidos a los ratones WT en estado basal. **A.** Inmunoblot representativo de pSREBP1. Los resultados fueron normalizados por proteína total detectada con Stain free (Figura suplementaria 1). #, $P < 0,05$ basal vs. ayuno 48 h; y †, $P < 0,05$ ayuno 48 h vs. realimentado. **B.** Inmunoblot representativo de mSREBP1. Los resultados fueron normalizados por Histona H3. *, $P < 0,05$ WT vs. *Pask*^{-/-}; y †, $P < 0,05$ ayuno 48 h vs. realimentado.

4 EFECTO DE LA EXENDINA-4 (Ex4) EN LA FUNCIÓN HEPÁTICA

La Ex4 es un análogo del GLP-1 utilizado en el tratamiento de diabetes tipo 2. En áreas hipotalámicas, se ha visto que este agente antidiabetogénico puede regular a sensores metabólicos como la AMPK o la P70S6K [152]. Estos sensores son a su vez regulados por PASK que también es clave en el mecanismo de señalización del GLP-1 [107, 108].

Como hemos visto anteriormente, la adaptación a cambios nutricionales de las rutas metabólicas hepáticas se encuentra alterada por la deficiencia de PASK. Por estas razones, analizamos el efecto de la Ex4 sobre la expresión de PASK y sobre la expresión de factores de transcripción y enzimas claves en la adaptación a ayuno/alimentación de las rutas metabólicas hepáticas en estos ratones *Pask*^{-/-}.

4.1 La Ex4 regula la expresión de la enzima PASK a nivel hepático

Para analizar el efecto de la Ex4 sobre la expresión de *Pask*, se analizaron mediante qRT-PCR los niveles de ARNm en hígado de ratones WT ayunados 48 h y realimentados 3 h o en estado basal (sin ayuno), en presencia o ausencia de Ex4 (250 ng/ 100 g peso).

La expresión de PASK estaba suprimida durante el ayuno con respecto al basal y la recuperación fue lenta tras la realimentación no produciéndose en las primeras 3 h. La Ex4 disminuyó la expresión de PASK en todas las condiciones (**Figura 30**).

Resultados

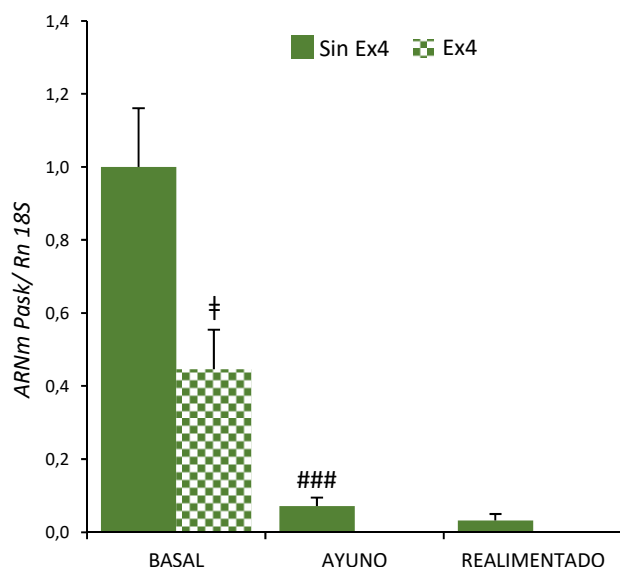


Figura 30. Bloqueo de la expresión de PASK por Ex4. qRT-PCR del gen *Pask*. Se utilizó ARNm hepático de ratones WT ayunados (48 h), realimentados (3 h) y basales tratados en presencia o ausencia de Ex4 (3 h). Los resultados son la media \pm SEM; $n = 4-5$ animales por condición, fueron normalizados con *Rn18S* y referidos a la condición basal sin Ex4. ###, $P < 0,001$ basal vs. ayuno 48 h; y ‡, $P < 0,05$ sin Ex4 vs. Ex4.

4.2 Regulación de la expresión de enzimas y factores de transcripción por Ex4

Para analizar el efecto de la Ex4 sobre la expresión de factores de transcripción y enzimas que regulan el metabolismo hepático en condiciones de ayuno/alimentación, se llevó a cabo qRT-PCR utilizando ARN hepático de ratones WT y *Pask*^{-/-} ayunados (48 h) o en estado basal. En presencia o ausencia de Ex4 (3 h) (250 ng/ 100 g peso).

La presencia de Ex4 disminuyó la expresión de la mayor parte de los factores de transcripción y las enzimas que, generalmente, se habían descrito que estaban estimulados por ayuno. Cuando los animales se encontraban en condiciones de alimentación (**Tabla 9A**): disminuyó la expresión de *Pgc1 α* , *Foxo1* y *Ppar γ* , de acuerdo con ello disminuyó la expresión de la *Cpt1 α* y *M-cad* que activa el transporte de ácidos grasos y la oxidación en ambos tipos de ratones WT y deficientes en PASK. Asimismo, el tratamiento con Ex4 en condiciones de ayuno inhibió la expresión de *Foxo1*, pero el efecto sobre *Pgc1 α* fue diferente porque aumentó la expresión, siendo significativo en ratones deficientes en PASK. Además, la presencia de Ex4 bloqueó totalmente la expresión de *Ppara* y *Cpt1 α* mientras que no se

observaron cambios en los niveles de *M-cad*. Por otra parte, el efecto de la Ex4 sobre la expresión de *Ppar γ* en condiciones de ayuno difiere en ratones WT y deficientes en PASK, aumentando significativamente en WT y disminuyendo en *Pask*^{-/-} ayunados. Otro dato destacable fue el efecto de la Ex4 sobre la desacetilasa *Sirt2*, su expresión fue totalmente bloqueada en condiciones de ayuno en ambos tipos de ratones (**Tabla 9A**).

La Ex4 también inhibió la expresión de los factores de transcripción estimulados por alimentación *Lxra* y *Srebp1c* en ratones WT y deficientes en PASK. Este efecto está de acuerdo con la disminución de la expresión de los genes *L-pk*, *Acc*, *Fas* y *Scd1* que participan en la conversión del exceso de carbohidratos en lípidos, inhibiendo por tanto glucolisis y lipogénesis *de novo*. Sin embargo, el efecto de la Ex4 sobre *Chrebp* fue diferente en los ratones WT y PASK, no modificó su expresión en WT y la disminuyó significativamente en ratones *Pask*^{-/-}. Los tratamientos con Ex4 en condiciones de ayuno en general bloquearon la expresión de los genes activados por alimentación, que estaban ya en niveles muy bajos, con la excepción de la expresión de *Acc* que aumentó significativamente en ambos tipos de ratones (**Tabla 9B**).

Resultados

A

Factores de transcripción y enzimas activados por ayuno	Estado nutricional	Descenso (rojo) o incremento (verde) de la expresión(%) en presencia de Exendina-4 (3 h) (250ng/100g peso)	
		WT	<i>Pask</i> ^{-/-}
PGC1α	BASAL	-83 ±17 [‡]	-96,2 ±1,7 ^{‡‡}
	AYUNO	46,9 ±42,6	194,2 ±32,3 ^{‡‡}
FOXO1	BASAL	-47 ±3 [‡]	-94,7 ±0,7 ^{‡‡}
	AYUNO	-52,9 ±21,8	-70,9 ±4,5
PPARα	BASAL	-41 ±48	-99,9 ±0,07
	AYUNO	-99,5 ±0,32 [‡]	-99,1 ±1,5 ^{‡‡‡}
PPARγ	BASAL	-99 ±0,4	-91,3 ±6,7 ^{‡‡}
	AYUNO	694,6 ±146,9 ^{‡‡‡}	-52,6 ±12,6
CPT1α	BASAL	-87 ±8	-82 ±1,2 ^{‡‡‡}
	AYUNO	-100 ±0,002 ^{‡‡}	-79,5 ±12,9
MCAD	BASAL	-63 ±2 [‡]	-85,1 ±1,4
	AYUNO	-26,6 ±23,4	79,8 ±44,2
SIRT2	BASAL	-45 ±22	-89 ±7,2 [‡]
	AYUNO	-84 ±10,4 [‡]	-98 ±0,6 ^{‡‡}

B

Factores de transcripción y enzimas activados por alimentación	Estado nutricional	Descenso (rojo) o incremento (verde) de la expresión (%) en presencia de Exendina-4 (3 h) (250ng/100g)	
		WT	<i>Pask</i> ^{-/-}
LXRα	BASAL	-57 ±29	-93,4 ±2,4 ^{‡‡‡}
	AYUNO	-95 ±3,6	-94,2 ±1,4 ^{‡‡}
SREBP1C	BASAL	-100 ±0,0003	-100 ±0,00004
	AYUNO	-100 ±0,04	-90,9 ±2,72
CHREBP	BASAL	-45 ±11	-93,7 ±3,7 [‡]
	AYUNO	-52,3 ±4,7	-97,8 ±2,1
L-PK	BASAL	-75 ±17	-96 ±2,1 ^{‡‡}
	AYUNO	-41,1 ±23,5	-64,7 ±11,7
ACC	BASAL	-58 ±10	-90,3 ±4,9 ^{‡‡}
	AYUNO	640 ±48 ^{‡‡‡}	171,2 ±4,5 ^{‡‡}
FAS	BASAL	-90 ±3	-94,5 ±1,8 [‡]
	AYUNO	-99 ±0,7 [‡]	99,7 ±0,1
SCD1	BASAL	-93 ±5 [‡]	-98 ±1,2 ^{‡‡‡}
	AYUNO	-96,6 ±3,3	-76,6 ±10

Tabla 9. Efecto de Exendina-4 (Ex4) en la regulación de la expresión de enzimas y factores de transcripción por ayuno/alimentación. qRT-PCR de enzimas y factores de transcripción hepáticos. Se analizaron los niveles de ARNm en hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) que se encontraban en ayuno de 48h o en estados basal tratados en presencia o ausencia de Ex4 (3 h). La tabla representa los valores del efecto de la Ex4 expresado en porcentaje. Los datos fueron normalizados con *β-actina*. El valor obtenido en el WT basal sin tratar con Ex4 fue tomado como 100%. La escala de colores representa en verde el efecto positivo de la Ex4 sobre la expresión, mientras que el rojo el efecto inhibitorio de la Ex4. A mayor intensidad de color, mayores efectos. Los resultados son la media ± SEM; n = 4-5 animales por condición. Factores de transcripción y enzimas activados por ayuno y alimentación. ‡, *P*<0,05; ‡‡, *P*<0,01; ‡‡‡, *P*<0,001 sin Ex4 vs. Ex4.

4.3 Regulación de la expresión de la proteína PEPCK por Ex4 en condiciones de ayuno/alimentación

La expresión de PEPCK se analizó mediante Western Blot en ratones WT y deficientes en PASK ayunados 48 h, realimentados 3 h o en estado basal. Tratados o sin tratar con Ex4 durante 3 h (250 ng/ 100 g peso).

El tratamiento de 3h con Ex4 no promovió diferencias significativas en la expresión de PEPCK (**Figura 31**)

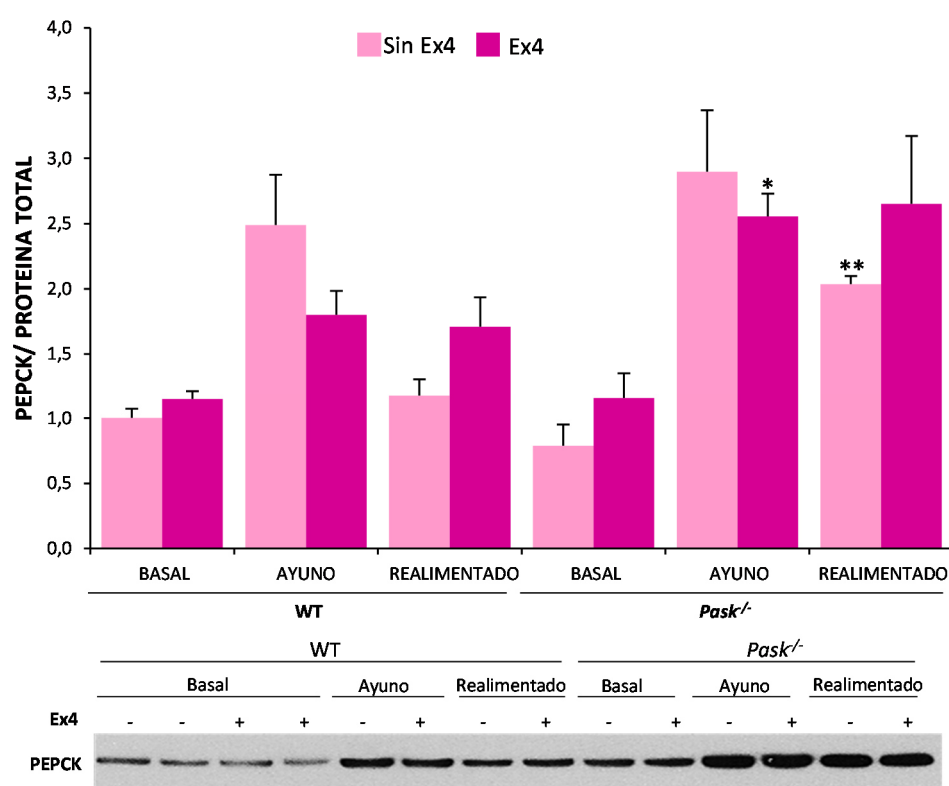


Figura 31. Efecto de la Ex4 sobre la expresión de la proteína PEPCK. Inmunoblot de PEPCK. Se utilizaron lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) ayunados (48 h), realimentados (3 h) o en estado basal tratados en presencia o ausencia de Ex4 (3 h). Los datos fueron normalizados por proteína total detectada con Stain free (Figura suplementaria 1) y referidos al WT en estado basal sin tratar con Ex4. Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición. *, *P* < 0,05; **, *P* < 0,01 WT vs. *Pask*^{-/-}. Se muestra un inmunoblot representativo.

4.4 Efecto de la Ex4 en la señalización de la insulina en ratones *Pask*^{-/-}

La Ex4 estimula la secreción de insulina en células β pancreáticas de una manera dependiente de glucosa. El efecto del tratamiento con Ex4 (3 h) (250 ng/ 100 g peso) en la señalización de la insulina a nivel hepático fue analizada en ratones WT y deficientes en PASK mediante Western Blot de lisados en condiciones de ayuno (48 h), realimentación (3 h) o estado basal.

Los niveles de Akt no fueron modificados significativamente por el tratamiento con Ex4 (**Figura 32A**). No obstante, la presencia de Ex4 bloqueó la activación de Akt en condiciones basales en ambos tipos de ratones, sin embargo, la sobreactivación de la Akt durante el ayuno y realimentación en ratones *Pask*^{-/-} no fue inhibida por la Ex4 (**Figura 32B**).

Con respecto al efecto de la Ex4 sobre la expresión de la proteína PTEN, en los ratones WT fue significativo el incremento en alimentaciones cortas, sin embargo disminuyó en condiciones basales. Por el contrario, en ratones deficientes en PASK aumento tras la alimentación y no se observaron cambios significativos en estado basal de los niveles de PTEN (**Figura 33**).

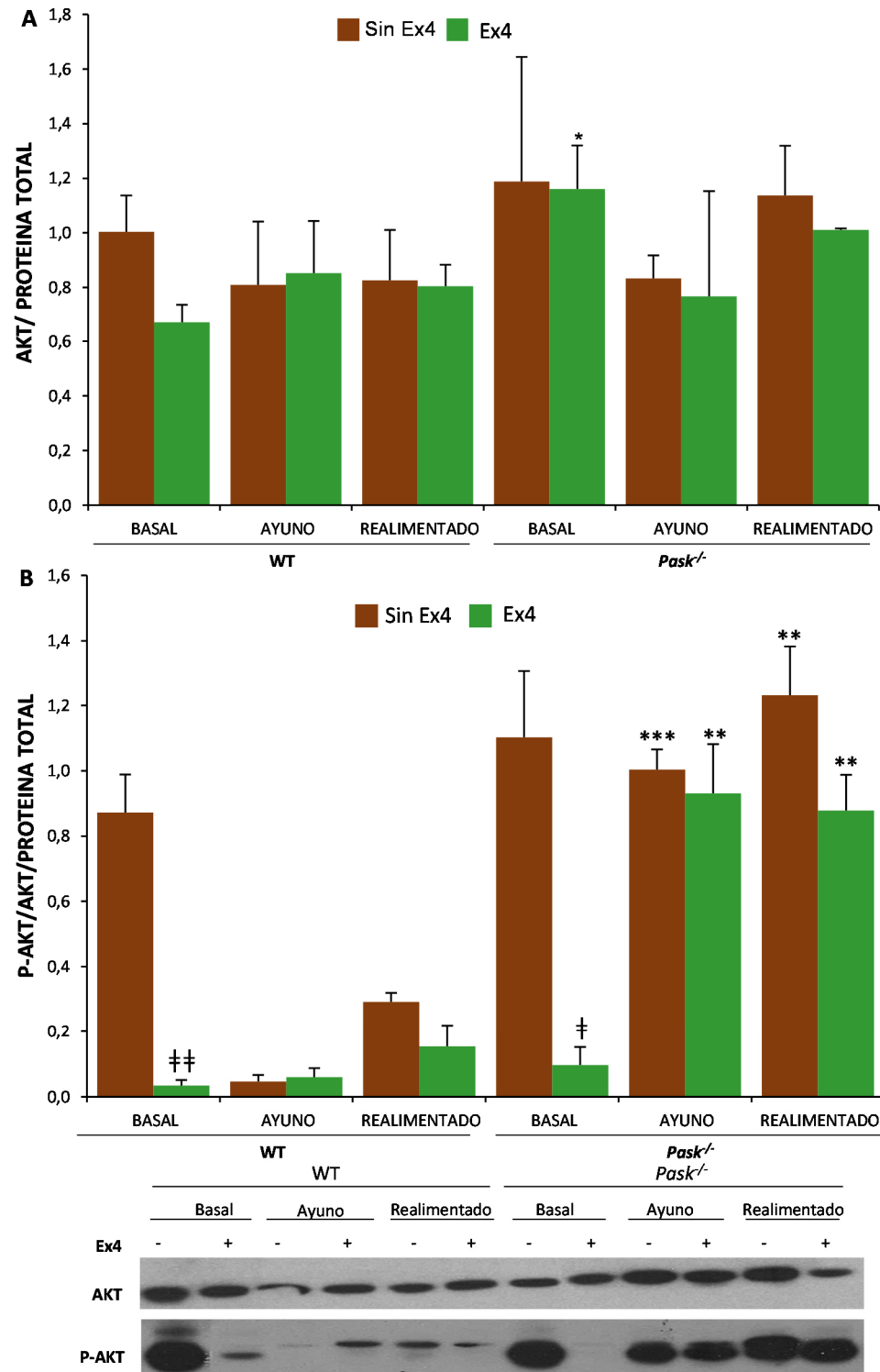


Figura 32. Efecto de la deficiencia de PASK en la respuesta a Exendina-4 (Ex4) de la ruta de la insulina. Inmunoblots representativos de Akt (A) y P-Akt (Ser-473) (B). Se utilizaron lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) ayunados (48 h), realimentados (3 h) o en estado basal tratados en presencia o ausencia de Ex4 (3 h). Los datos fueron normalizados por proteína total detectada con Stain free (Figura suplementaria 1) y referidos al WT en estado basal sin tratar con Ex4. Los resultados son la media \pm SEM; $n = 4-5$ animales por condición. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; †, $P < 0,05$; ††, $P < 0,01$ sin Ex4 vs. Ex4.

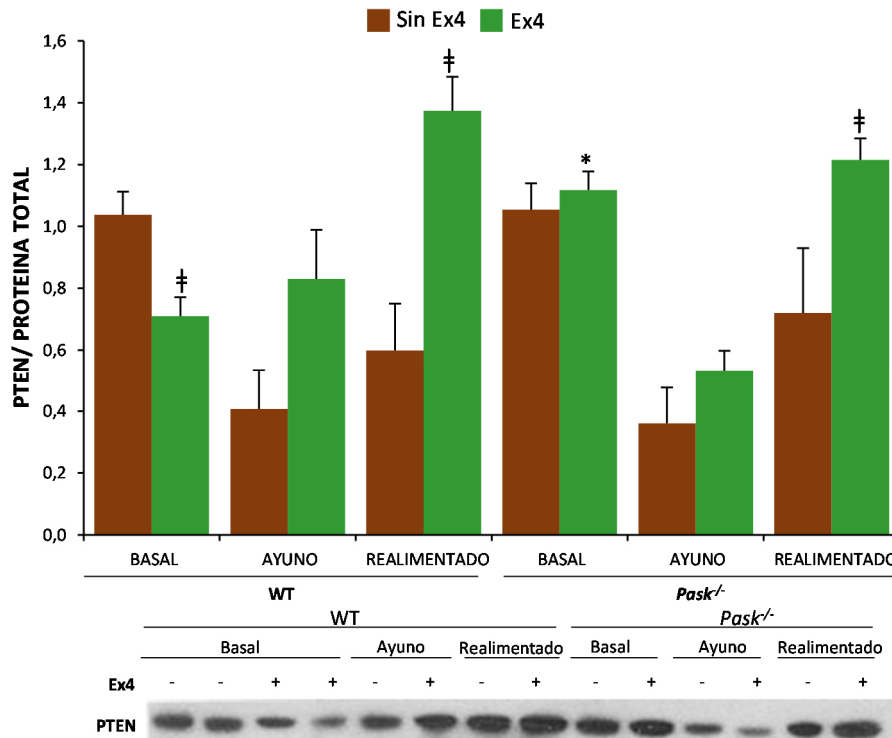


Figura 33. Efecto de la exendina-4 (Ex4) sobre la expresión de la proteína PTEN. Inmunoblot representativo de PTEN. Se utilizaron lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) ayunados (48 h), realimentados (3 h) o en estado basal tratados en presencia o ausencia de Ex4 (3 h). Los datos fueron normalizados por proteína total detectada con Stain free (Figura suplementaria 1) y referidos al WT en estado basal sin tratar con Ex4. Los resultados son la media \pm SEM; n = 4-5 animales por condición. *, $P < 0,05$ WT vs. *Pask*^{-/-}; ‡, $P < 0,05$ sin Ex4 vs. Ex4.

5 OBESIDAD INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN GRASA

Se ha visto que los ratones deficientes en PASK son resistentes a la obesidad y al desarrollo de la resistencia a insulina inducida por dietas ricas en grasa, además de ser hipermetabólicos y estar protegidos de la esteatosis hepática [111].

Como mostramos anteriormente, los ratones *Pask*^{-/-} presentan alteraciones importantes en la adaptación de las rutas metabólicas en respuesta a ayuno y alimentación.

Por estas razones, sometimos a ratones WT y deficientes en PASK a una dieta rica en grasa (HFD) para comparar los mecanismos de adaptación del hígado a los cambios nutricionales y analizar el papel de PASK en estos mecanismos.

5.1 Resistencia de ratones *Pask*^{-/-} a las alteraciones provocadas por una dieta rica en grasa

La obesidad inducida por dietas ricas en grasa es uno de los principales modelos para analizar las consecuencias de este tipo de alimentación sobre la composición del cuerpo y el comportamiento de ciertas hormonas.

Ratones WT y deficientes en PASK fueron alimentados durante 3 meses con una dieta estándar (SFD) y una dieta rica en grasa (HFD). Semanalmente fueron pesados y se midieron las glucemias. Ratones WT alimentados con HFD experimentaron un incremento de peso que comenzó a ser altamente significativo desde la 3ª semana de tratamiento con respecto a los alimentados con SFD, en cambio, en los ratones *Pask*^{-/-} este incremento de peso no llegó a ser tan significativo y comenzó a producirse más tarde. El aumento de peso, provocado por HFD, en ratones *Pask*^{-/-} fue significativamente más bajo con respecto a los ratones WT (**Figura 34A**).

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de diabetes produciéndose una resistencia a la acción de la insulina. Se pudo observar que ratones WT alimentados con HFD ya presentaron altos valores de glucosa en sangre a las 2 semanas, en un rango que va desde 163±4 hasta 237±16 mg/dL a lo largo del tratamiento, comparado con los alimentados con SFD, cuyos valores están comprendidos entre 128±3,5 mg/dL y 160±4 mg/dL. Sin embargo, los ratones *Pask*^{-/-} presentaron valores similares con ambos tipos de dieta, oscilando desde 122±5,4 a 149±6 mg/dL con HFD y desde 107,5±6,7 a 143±1,4 mg/dL con SFD (**Figura 34B**), esto puede indicar que la deficiencia de PASK puede evitar el desarrollo de la hiperglucemia provocada por HFD.

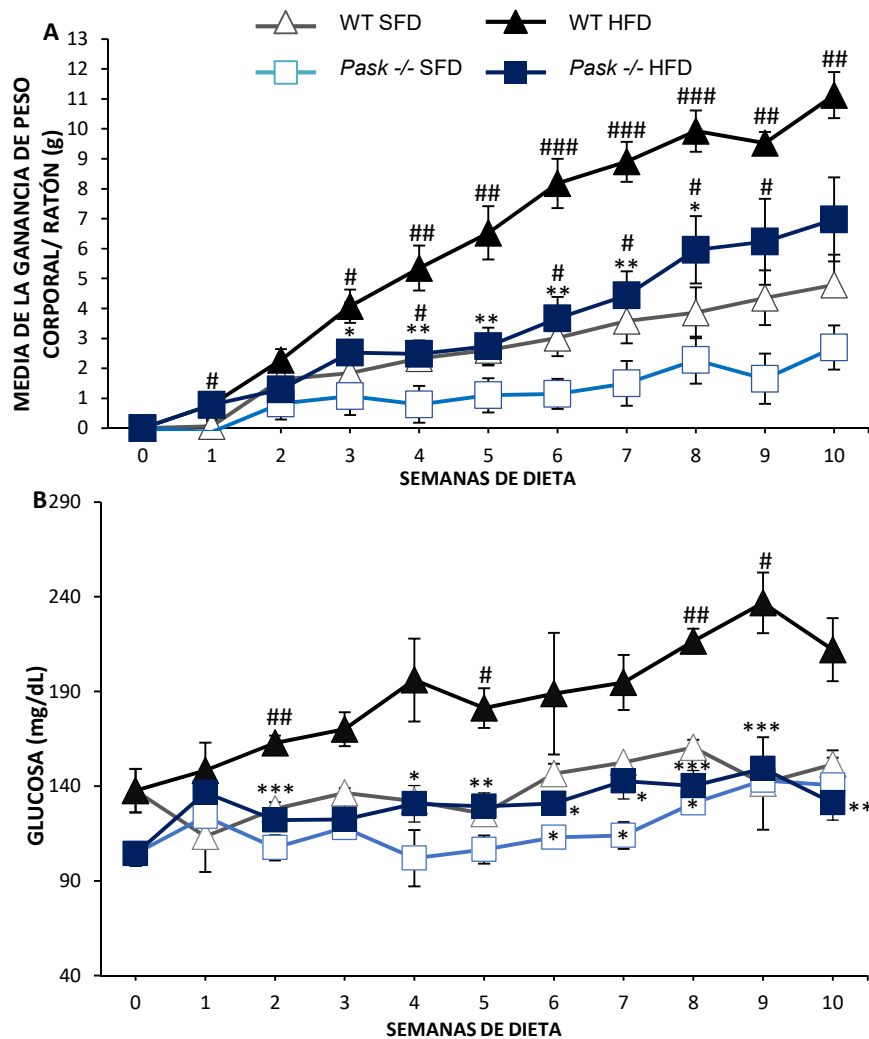


Figura 34. Efecto de la deficiencia de PASK sobre el incremento de peso y la glucemia. Medida del incremento de peso (A) y de la concentración de glucosa en sangre (B). Ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) fueron alimentados con una dieta estándar (SFD Δ WT y \square *Pask*^{-/-}) y una dieta rica en grasa (HFD \blacktriangle WT y \blacksquare *Pask*^{-/-}) durante 3 meses. Se tomaron medidas semanalmente durante 10 semanas de los parámetros analizados. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; #, $P < 0,05$; ##, $P < 0,01$; ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD.

5.2 La deficiencia de PASK mejora la homeostasis de glucosa y la sensibilidad a insulina en ratones alimentados con HFD

La homeostasis de glucosa y la sensibilidad insulina son claves para el funcionamiento del cuerpo humano y están relacionadas con el desarrollo de ciertas enfermedades. Ambas

juegan un papel importante en el metabolismo y pueden estar reguladas por la composición de la dieta.

A los ratones WT y deficientes en PASK alimentados con SFD y HFD se les realizó un test de tolerancia a glucosa (TTG) para lo cual fueron ayunados durante toda la noche y un test de tolerancia a insulina (TTI) tras un ayuno previo de 4 h.

En el TTG, los ratones WT alimentados con HFD, a los 30 minutos, alcanzaron picos más altos de glucosa que los deficientes en PASK alimentados con el mismo tipo de dieta. Se observó una aparente intolerancia a glucosa en los ratones WT, ya que tras 2 h, sus valores de glucosa en sangre se mantuvieron más elevados, $175 \pm 38,9$ mg/dL frente a $120,8 \pm 14,8$ mg/dL de los ratones *Pask*^{-/-}. Esto puede indicar que la deficiencia de PASK puede contribuir a evitar la alteración de la homeostasis de glucosa provocada por HFD (**Figura 35A**).

Los ratones *Pask*^{-/-}, tanto alimentados con SFD como con HFD, presentaron una mayor sensibilidad a insulina ya que en el TTI los valores de glucosa en sangre se mantuvieron bajos transcurridas 2 h, mientras que en ratones los WT mantuvieron niveles de glucosa superiores a 100 mg/dL (**Figura 35B**).

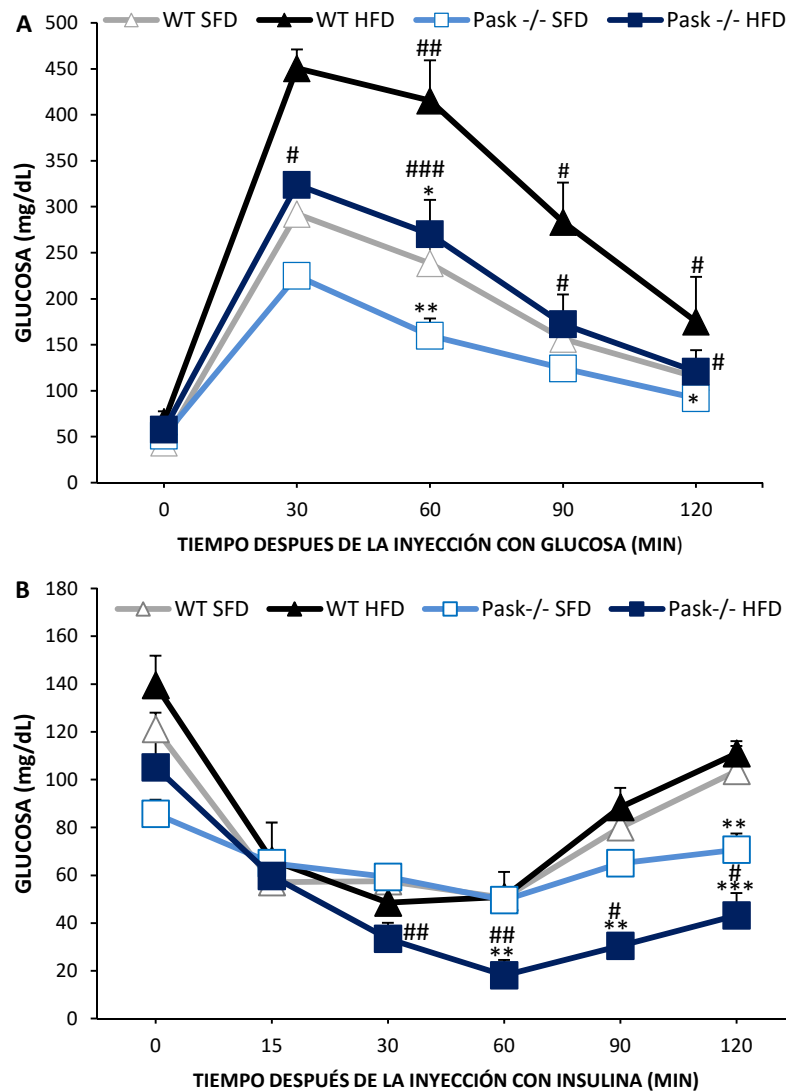


Figura 35. Efecto de la deficiencia de PASK sobre la homeostasis de glucosa y la sensibilidad a insulina. Test de tolerancia a glucosa (A) y test de tolerancia a insulina (B). Se les realizó a ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) alimentados con dieta estándar (SFD Δ WT y \square *Pask*^{-/-}) y dieta rica en grasa (HFD \blacktriangle WT y \blacksquare *Pask*^{-/-}). A. Se ayuno a los ratones toda la noche y se tomaron muestras de sangre a tiempo 0, 30, 60, 90 y 120. B. Se ayuno a los ratones 4 h y se tomaron muestras de sangre a tiempo 0, 15, 30, 60, 90 y 120. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; #, $P < 0,05$; ##, $P < 0,01$; ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD.

5.3 La deficiencia de PASK protege del aumento de los niveles de insulina y colesterol y del acúmulo de lípidos hepáticos inducidos por HFD

Una ingesta elevada de grasa puede afectar a los niveles de insulina en sangre y también puede dar lugar a una alteración de los parámetros lipídicos.

La medida de los niveles de insulina en sangre se realizó mediante un ELISA utilizando el plasma de ratones WT y deficientes en PASK alimentados con SFD y HFD. Los resultados indicaron que la HFD provoca un aumento de los niveles de insulina en sangre, como era de esperar, de tres veces en ratones WT y dos veces en los deficientes en PASK si los comparamos con los alimentados con SFD.

Por otro lado, se midieron también los parámetros lipídicos. Se observó que los niveles de colesterol total (CHT) en ratones WT alimentados HFD fueron más elevados ($143,5 \pm 13,7$ mg/dL) que las de sus controles alimentados con SFD ($95,2 \pm 7$ mg/dL), mientras que en ratones *Pask*^{-/-} estos valores fueron similares con ambos tipos de dieta, $108 \pm 3,7$ mg/dL con HFD, frente a $97,5 \pm 5,2$ mg/dL con SFD. Sin embargo, los valores de triglicéridos (TG) no difieren significativamente entre ambos tipos de ratones (**Tabla 10**).

	Insulina (ng/ml)	CHT (mg/dL)	TG (mg/dL)
WT SFD	$0,84 \pm 0,1$	$95,2 \pm 7,03$	$146,5 \pm 25,07$
WT HFD	$2,85 \pm 0,2##$	$143,5 \pm 13,7\#$	$118 \pm 11,3$
<i>Pask</i>^{-/-} SFD	$1,13 \pm 0,1$	$97,5 \pm 5,2$	$115,5 \pm 12,6$
<i>Pask</i>^{-/-} HFD	$2,72 \pm 0,7$	$108 \pm 3,7^*$	$105,7 \pm 10,2$

Tabla 10. Niveles de insulina, colesterol total (CHT) y triglicéridos (TG) en plasma. En la tabla se muestran los valores de insulina (ng/ml), colesterol (mg/dL) y triglicéridos (mg/dL) de ratones WT y *Pask*^{-/-} alimentados con dieta estándar (SFD) y dieta rica en grasa (HFD). Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. *, $P < 0,05$ WT vs. *Pask*^{-/-}; #, $P < 0,05$, ##, $P < 0,01$ SFD vs. HFD

Mediante una tinción con el colorante Red Oil, se pudo observar que ratones WT alimentados con HFD presentaban un mayor acúmulo de gotas lipídicas en el hígado que los deficientes en PASK alimentados con el mismo tipo de dieta, indicando una mayor protección de ratones *Pask*^{-/-} a acumular gotas lipídicas. Con respecto SFD, no se observan diferencias entre ambos tipos de ratones (**Figura 36**).

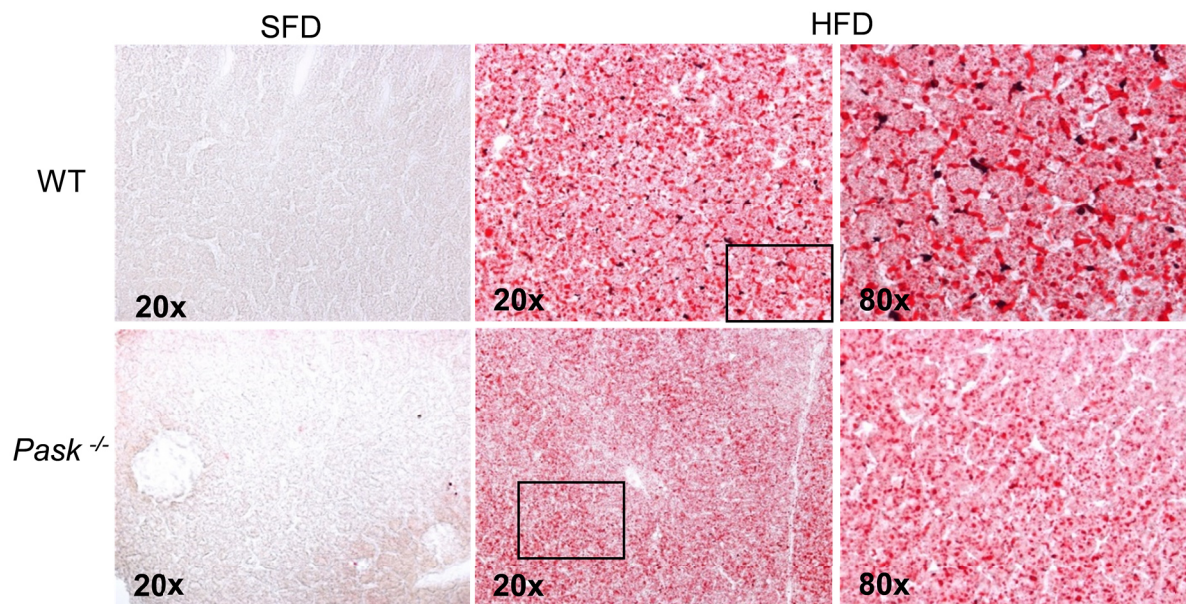


Figura 36. Disminución de la acumulación de gotas lipídicas en los ratones *Pask*^{-/-} alimentados con HFD. Tinción con el colorante Red Oil. Se utilizaron cortes del hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) alimentados con dieta estándar (SFD) y dieta rica en grasa (HFD) en condiciones de alimentación. Los recuadros muestran la magnificación (80x) de algunas áreas, para observar los detalles.

6 LA DIETA RICA EN GRASA ALTERÓ LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *Pask* POR CAMBIOS NUTRICIONALES

Los niveles de ARNm del gen *Pask* se midieron mediante qRT-PCR utilizando el ARN hepático de ratones WT C57BL/6J alimentados con SFD y HFD en condiciones de alimentación y ayuno (48 h).

Con SFD, el ayuno provocó una disminución significativa de la expresión de *Pask*, sin embargo, la HFD anuló el efecto del ayuno. La expresión de *Pask* en ayuno con HFD fue más elevada que en condiciones basales con SFD (**Figura 37**).

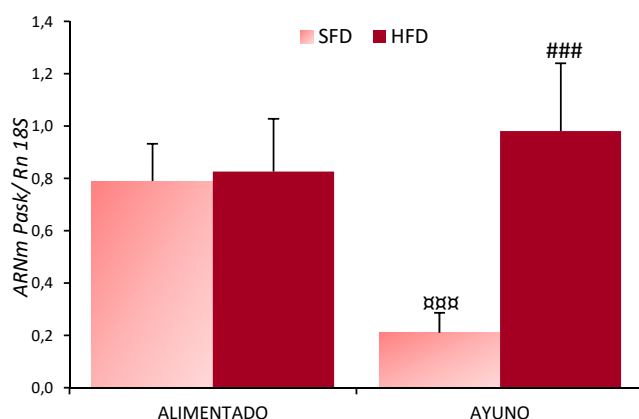


Figura 37. Efecto de la dieta rica en grasa sobre la expresión de *Pask*. Se midieron los niveles de ARNm del gen *Pask* en el hígado de ratones WT alimentados con dieta estándar (SFD) o dieta rica en grasa (HFD) mediante qRT-PCR. Los ratones estaban ayunados 48 h o en condiciones basales de alimentación. Los valores se normalizaron con *Rn18S* y fueron referidos al ratón alimentado con SFD. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD; ****, $P < 0,001$ alimentado vs. ayuno.

7 LA DEFICIENCIA DE PASK ALTERÓ LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE GLP-1

El GLP-1 o su análogo la Ex4 son fármacos utilizados para el tratamiento de la diabetes tipo 2/obesidad ya que pueden estimular la secreción de insulina, regular el apetito y la ingesta de comida. Además, se ha visto que la Ex4 puede revertir la esteatosis hepática en ratones obesos [148].

El GLP-1 o sus análogos ejercen su acción mediante su unión a receptores específicos. Para observar el efecto de la dieta en la expresión de este receptor. Se midieron los niveles de ARNm mediante qRT-PCR en hígado de ratones WT y deficientes en PASK alimentados con SFD y HFD en condiciones de alimentación y de ayuno (48 h).

En ratones WT, el ayuno bloqueó la expresión del gen del receptor de GLP-1 (*Glp1r*). Sin embargo, en ratones *Pask*^{-/-} alimentados con SFD el ayuno mantuvo la expresión del receptor de GLP-1 igual que en su estado basal. La HFD no modificó la expresión de *Glp1r* en ratones WT, mientras que incrementó su expresión 4 veces en ratones *Pask*^{-/-}. Además, los ratones *Pask*^{-/-} con HFD presentaron una disminución significativa de *Glp1r* en respuesta a situaciones de ayuno, a diferencia de lo que ocurría con la dieta estándar (**Figura 38**). La deficiencia de PASK cambia el efecto de HFD en la expresión de los receptores de GLP-1.

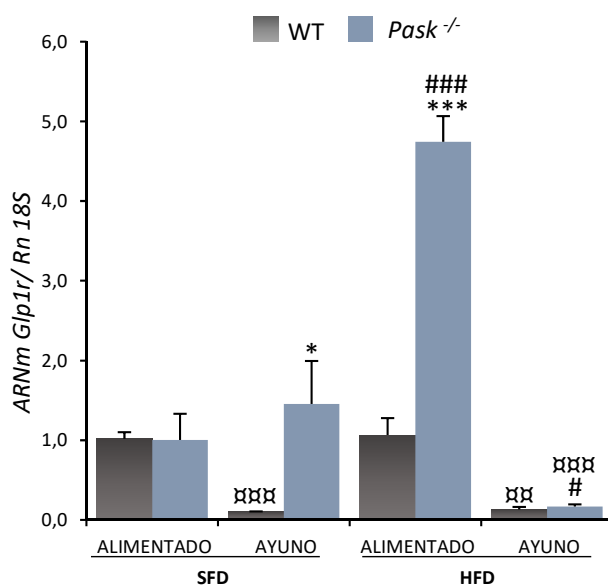


Figura 38. Efecto de la deficiencia de PASK sobre el efecto de HFD en la expresión del receptor de GLP-1 hepático. qRT-PCR del gen *Glp1r*. Los niveles de ARNm se midieron en hígado de ratones WT y *Pask*^{-/-} alimentados con una dieta estándar (SFD) o una dieta rica en grasa (HFD) y bien ayunados 48 h o en condiciones basales de alimentación. Los valores se normalizaron con *Rn18S* y fueron referidos al ratón WT alimentado con SFD. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,01$ WT vs. *Pask*^{-/-}; #, $P < 0,05$, ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD; $\alpha\alpha$, $P < 0,01$, $\alpha\alpha\alpha$, $P < 0,001$ alimentado vs. ayuno.

8 REGULACIÓN DE LA GLUCOQUINASA Y SU PROTEÍNA REGULADORA POR HFD

Hemos visto anteriormente, que la deficiencia de PASK altera la adaptación de la expresión y actividad de la GCK por cambios nutricionales. Por esta razón, comparamos también los efectos de la HFD sobre la GCK y la GCKR y su regulación por ayuno/alimentación.

8.1 La deficiencia de PASK provoca una alteración en la expresión de *Gck* y *Gckr* con HFD y en la regulación por ayuno/alimentación

La GCK es importante para el mantenimiento de la homeostasis y cambios en su expresión y actividad están relacionados con la obesidad.

El efecto de la dieta sobre la expresión de *Gck* y *Gckr* en respuesta a condiciones de ayuno/alimentación se analizó mediante qRT-PCR en hígados de ratones WT y deficientes en PASK, alimentados durante 3 meses con una SFD o una HFD, bajo condiciones de alimentación y ayuno (48 h).

La HFD incrementó la expresión de *Gck* en ratones WT y deficientes en PASK. Sin embargo, produjo menos alteraciones en su adaptación a ayuno/alimentación. De este modo, la expresión de *Gck* fue bloqueada en ayuno, aunque en ratones *Pask*^{-/-} la expresión es significativamente mayor que en los controles (**Figura 39A**).

La HFD provocó una disminución de la expresión de *Gckr* en ratones WT en ayuno, mientras que en ratones deficientes en PASK tiende a incrementarla con respecto a SFD. Al contrario que ocurría con SFD, la HFD incrementó la expresión de *Gckr* en periodos de ayuno en ratones *Pask*^{-/-}, a diferencia de lo que ocurre en los ratones WT (**Figura 39B**).

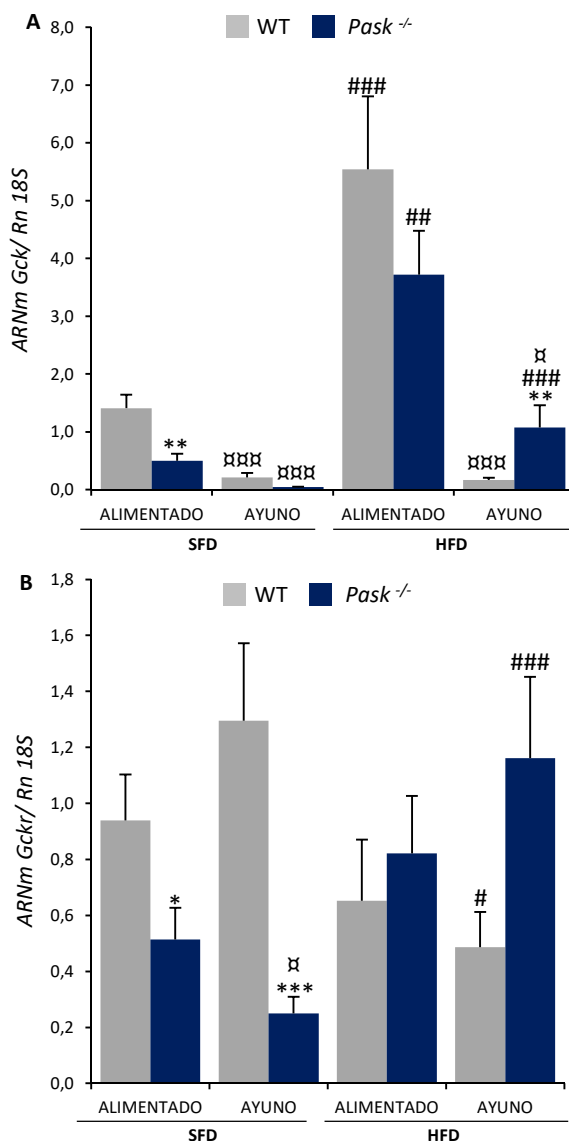


Figura 39. Alteración de la expresión de *Gck* y *Gckr* por HFD. qRT-PCR de los genes *Gck* y *Gckr*. Se midieron los niveles de ARNm en hígado de ratones WT y *Pask*^{-/-} sometidos durante 3 meses a una dieta estándar (SFD) o una dieta rica en grasa (HFD) bien en condiciones de ayuno (48 h) o basales de alimentación. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición, fueron normalizados con *Rn18S* y referidos al WT en la condición de alimentación con SFD. **A** y **B**. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; #, $P < 0,05$; ##, $P < 0,01$; ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD; α, $P < 0,05$; ααα, $P < 0,001$ alimentado vs. ayuno.

8.2 La deficiencia de PASK provoca la alteración de la expresión de las proteínas GCK y GCKR con HFD y su regulación por ayuno/alimentación

Para analizar el efecto de una HFD sobre la GCK y su proteína reguladora (GCKR) se realizaron Western Blot con lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK alimentados con SFD o HFD, que se encontraban en condiciones de alimentación y ayuno (48 h).

La HFD produjo un descenso en los niveles de expresión de la proteína GCK en condiciones de alimentación en ambos tipos de ratones. En ratones WT, el ayuno disminuyó los niveles de GCK con ambos tipos de dieta, pero su efecto fue mayor con HFD que con SFD. Sin embargo, en los ratones deficientes en PASK no se observaron diferencias entre ayuno y alimentación con HFD (**Figura 40**).

Con respecto a la GCKR, a nivel de proteína no se observaron diferencias entre ambos tipos de dieta en ninguno de los 2 tipos de ratones (**Figura 41**).

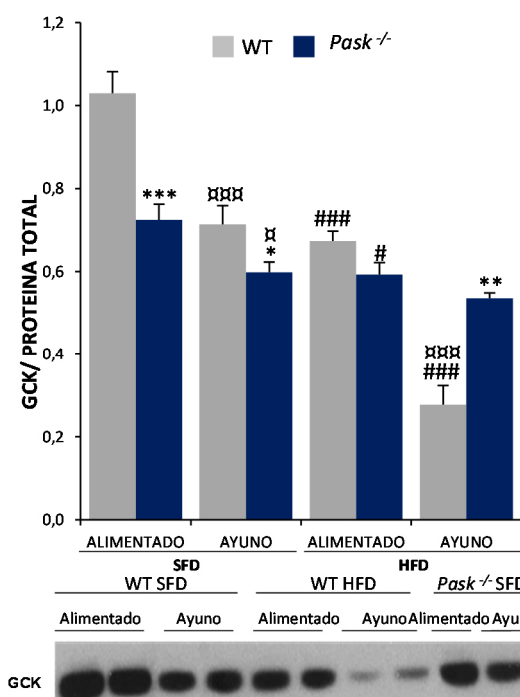
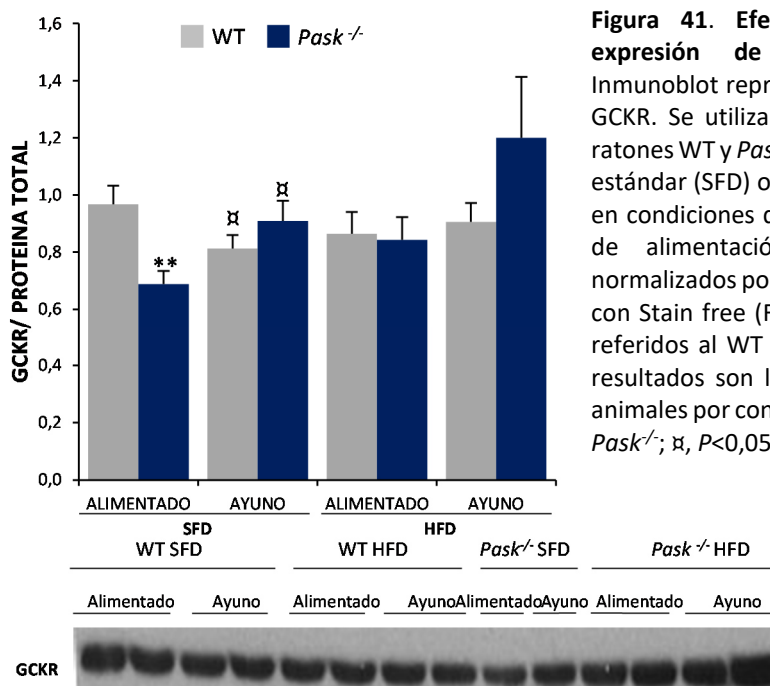


Figura 40. Efecto de HFD sobre la expresión de la proteína GCK. Inmunoblot representativo de la proteína GCK. Se utilizaron lisados hepáticos de ratones WT y *Pask*^{-/-} alimentados con dieta estándar (SFD) o dieta rica en grasa (HFD) en condiciones de ayuno (48 h) y basales de alimentación. Los datos fueron normalizados por proteína total detectada con Stain free (Figura suplementaria 1) y referidos al WT alimentado con SFD. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; #, $P < 0,05$; ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD; x, $P < 0,05$; xx, $P < 0,001$ alimentado vs. ayuno



8.3 La HFD alteró la localización subcelular de la GCK

Como se indicó anteriormente, la GCK está regulada por su proteína reguladora transportándola al núcleo e inactivándola en condiciones de ayuno, mientras que en periodos postprandiales se mantiene libre en el citoplasma.

Para ver qué efecto tiene la dieta sobre esta localización, se realizó inmunohistoquímica utilizando secciones de hígado de ratones WT y deficientes en PASK alimentados con SFD o HFD.

Resultados

En ratones WT, la HFD produjo una mayor localización de la GCK en el núcleo de los hepatocitos. Sin embargo, en ratones *Pask*^{-/-} la localización fue predominantemente nuclear con ambos tipos de dieta (**Figura 42**).

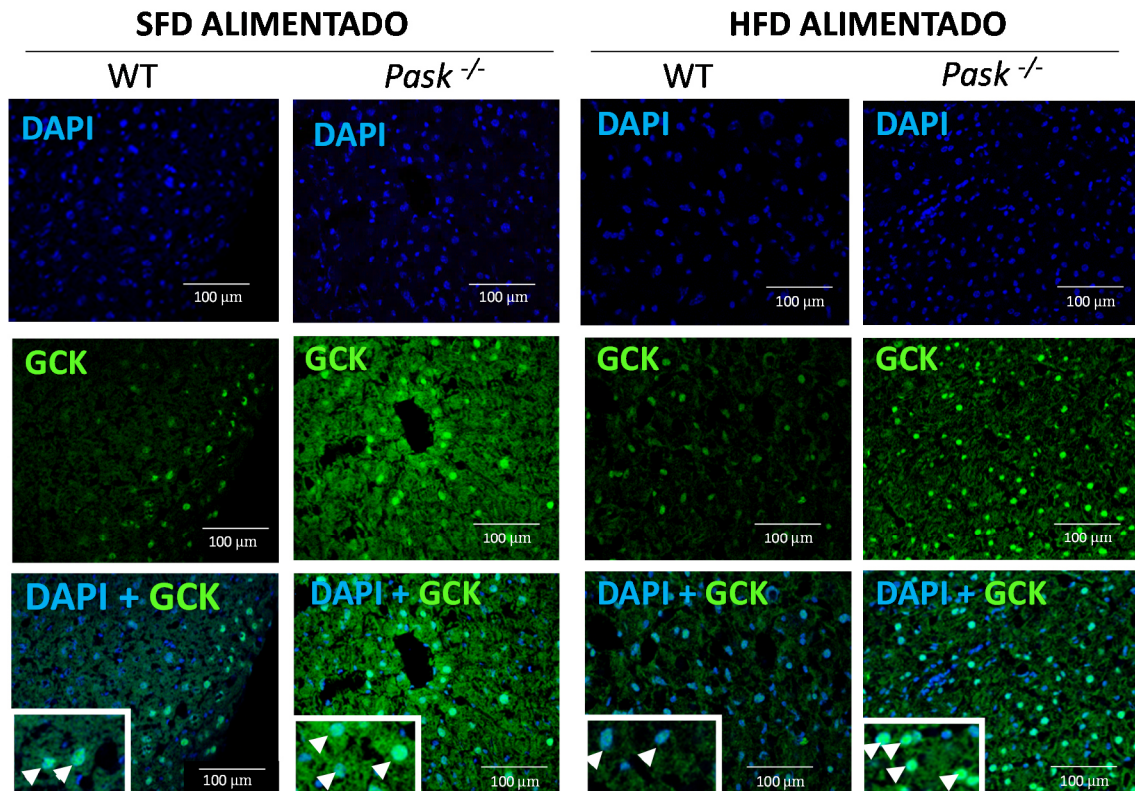


Figura 42. Efecto de la deficiencia de PASK y de HFD sobre la localización celular de la GSK. El análisis de la localización de la GSK se hizo mediante Inmunohistoquímica en cortes de hígados de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) en condiciones de alimentación con dieta estándar (SFD) o dieta rica en grasa (HFD). La localización subcelular de la GSK fue visualizada en verde (Alexa 488 acoplada a un anticuerpo secundario). Los recuadros muestran la magnificación de algunas áreas, para observar los detalles. El ADN de los núcleos fue teñido con DAPI (fluorescencia azul). Las flechas indican dónde se localiza el núcleo de los hepatocitos.

8.4 La actividad glucoquinasa se encuentra alterada en ratones *Pask*^{-/-}

Para analizar el efecto que la HFD tiene sobre la actividad glucoquinasa, se realizaron ensayos enzimáticos de la actividad glucoquinasa en ratones WT y deficientes en PASK alimentados con SFD o HFD.

La HFD no cambió significativamente la actividad glucoquinasa en ninguno de los 2 tipos de ratones. Aunque en los ratones deficientes en PASK la actividad glucoquinasa fue ligeramente inferior, al igual que ocurría en los ratones tratados con dieta estándar (**Figura 43 y Figura 21A**).

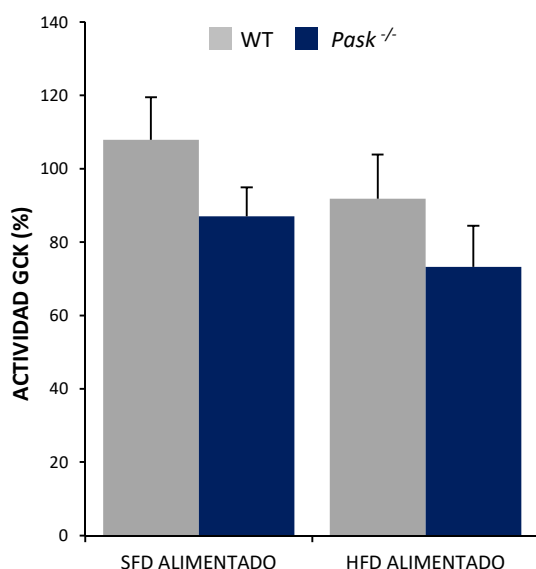


Figura 43. Efecto de la HFD sobre la actividad glucoquinasa. La actividad glucoquinasa se midió sustrayendo la actividad hexoquinasa medida a 0,3 mM glucosa de la actividad total medida a 30 mM. Para estos ensayos enzimáticos se utilizaron lisados de hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) en condiciones de alimentación con una dieta estándar (SFD) o una dieta rica en grasa (HFD). La actividad GSK es dada como la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición y es representado como porcentaje del valor del ratón WT alimentado con SFD.

9 EFECTO DE LA HFD EN LA ADAPTACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y ENZIMAS HEPÁTICAS A AYUNO Y ALIMENTACIÓN

La obesidad supone una alteración del balance energético. Dado que estas enzimas y factores de transcripción están implicados en rutas importantes en el mantenimiento del equilibrio energético, pueden verse alterados con una alimentación rica en grasa.

Hemos visto que la homeostasis de glucosa y sensibilidad a insulina se encuentran alterados en ratones control cuando son alimentados con HFD, sin embargo, parece que los ratones *Pask*^{-/-} ofrecen cierta resistencia al desarrollo de estas alteraciones. Además, algunos de estos factores y enzimas que se modulan por cambios nutricionales ya se encuentran alterados en ratones deficientes en PASK.

Resultados

Por esta razón, analizamos el efecto de HFD en la respuesta de factores de transcripción y enzimas que promueven la adaptación a ayuno/alimentación y si hay alteraciones en los ratones *Pask*^{-/-} con respecto a sus controles.

9.1 HFD modifica la respuesta de genes metabólicos hepáticos a ayuno y alimentación y la deficiencia de PASK contrarresta las alteraciones provocada por HFD

Para analizar si un consumo alto en grasa puede afectar a la regulación de estos genes por ayuno/alimentación, se llevó a cabo qRT-PCR para analizar la expresión de los genes de factores de transcripción y enzimas implicados en la regulación de las principales rutas metabólicas: gluconeogénesis, glucólisis y síntesis y degradación de ácidos grasos. Para ello se midieron los niveles de ARNm en hígado de ratones WT y deficientes en PASK que habían sido alimentados con SFD o HFD, bajo condiciones de alimentación y ayuno (48 h).

La HFD alteró la respuesta de ciertos genes a condiciones de ayuno/alimentación en ratones WT, mientras que los ratones deficientes en PASK parecían estar protegidos de estas alteraciones (**Figura 44 y 45**).

En ratones WT, los genes estimulados por ayuno con SFD se encontraban sobreexpresados en condiciones de alimentación con HFD (7x *Foxo1*, 300x *Pgc1α*, 76x *Ppara*, 17x *Pparγ*, 17x *M-cad*) con respecto a la SFD. Además, en condiciones de ayuno, la HFD también incrementó aún más la expresión de los genes estimulados por ayuno (3x *Foxo1*, 2x *Pgc1α*, 57x *Ppara*, 13x *M-cad*) con SFD. Estos efectos de HFD fueron bloqueados en ratones *Pask*^{-/-}. Los genes sobreexpresados en ratones WT con HFD no se estimulan por ayuno en ratones deficientes en PASK (*Foxo1*, *Pgc1α*, *Ppara*, *M-cad*, *G6Pasa*, *Pepck*, *Cpt1α*, *Sirt2*) con respecto a los controles alimentados con SFD en condiciones de ayuno (**Figura 44**).

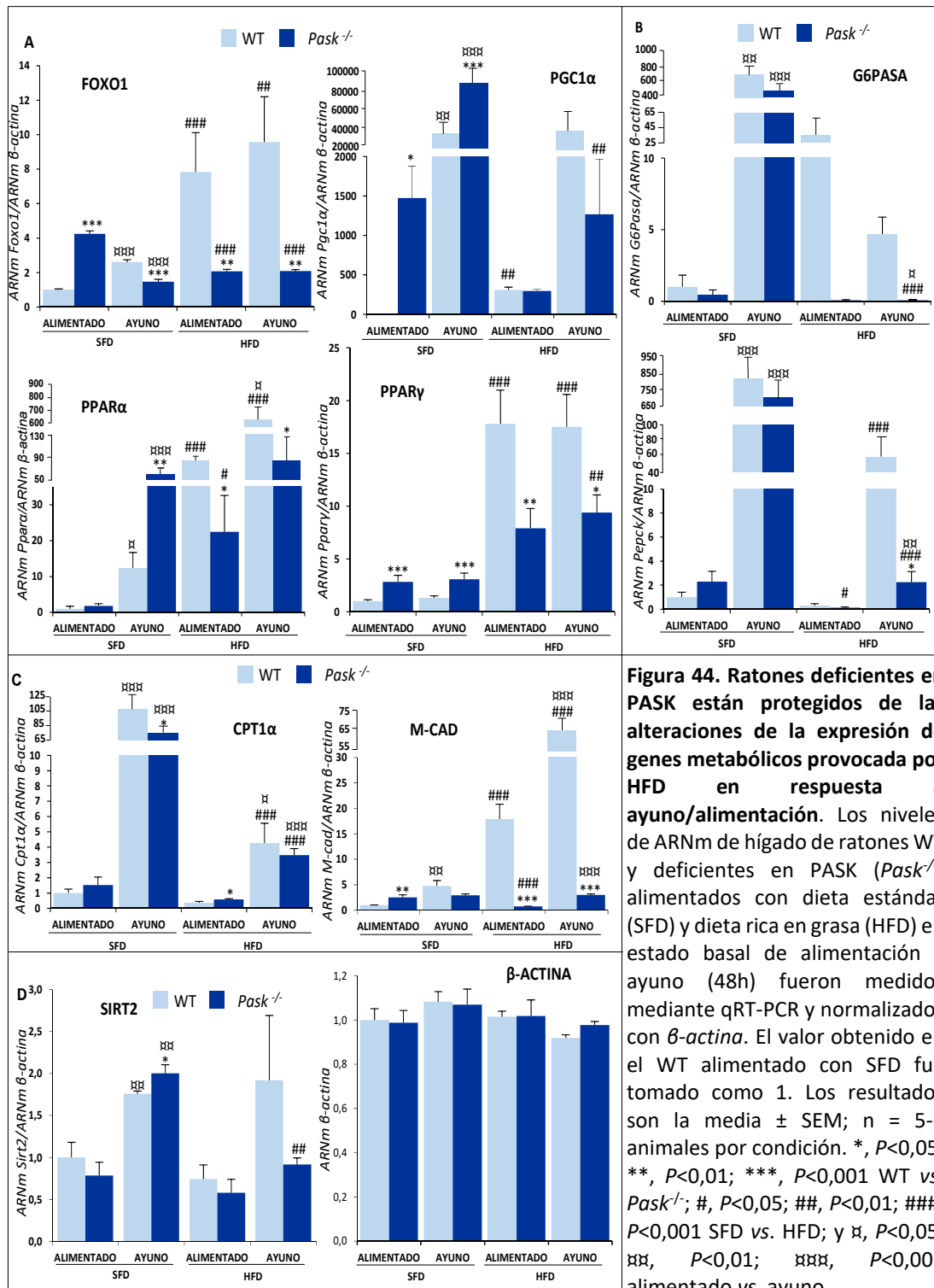


Figura 44. Ratones deficientes en PASK están protegidos de las alteraciones de la expresión de genes metabólicos provocada por HFD en respuesta a ayuno/alimentación. Los niveles de ARNm de hígado de ratones WT y deficientes en PASK ($Pask^{-/-}$) alimentados con dieta estándar (SFD) y dieta rica en grasa (HFD) en estado basal de alimentación y ayuno (48h) fueron medidos mediante qRT-PCR y normalizados con β -actina. El valor obtenido en el WT alimentado con SFD fue tomado como 1. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. $Pask^{-/-}$; #, $P < 0,05$; ##, $P < 0,01$; ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD; y α , $P < 0,05$; $\alpha\alpha$, $P < 0,01$; $\alpha\alpha\alpha$, $P < 0,001$ alimentado vs. ayuno.

Resultados

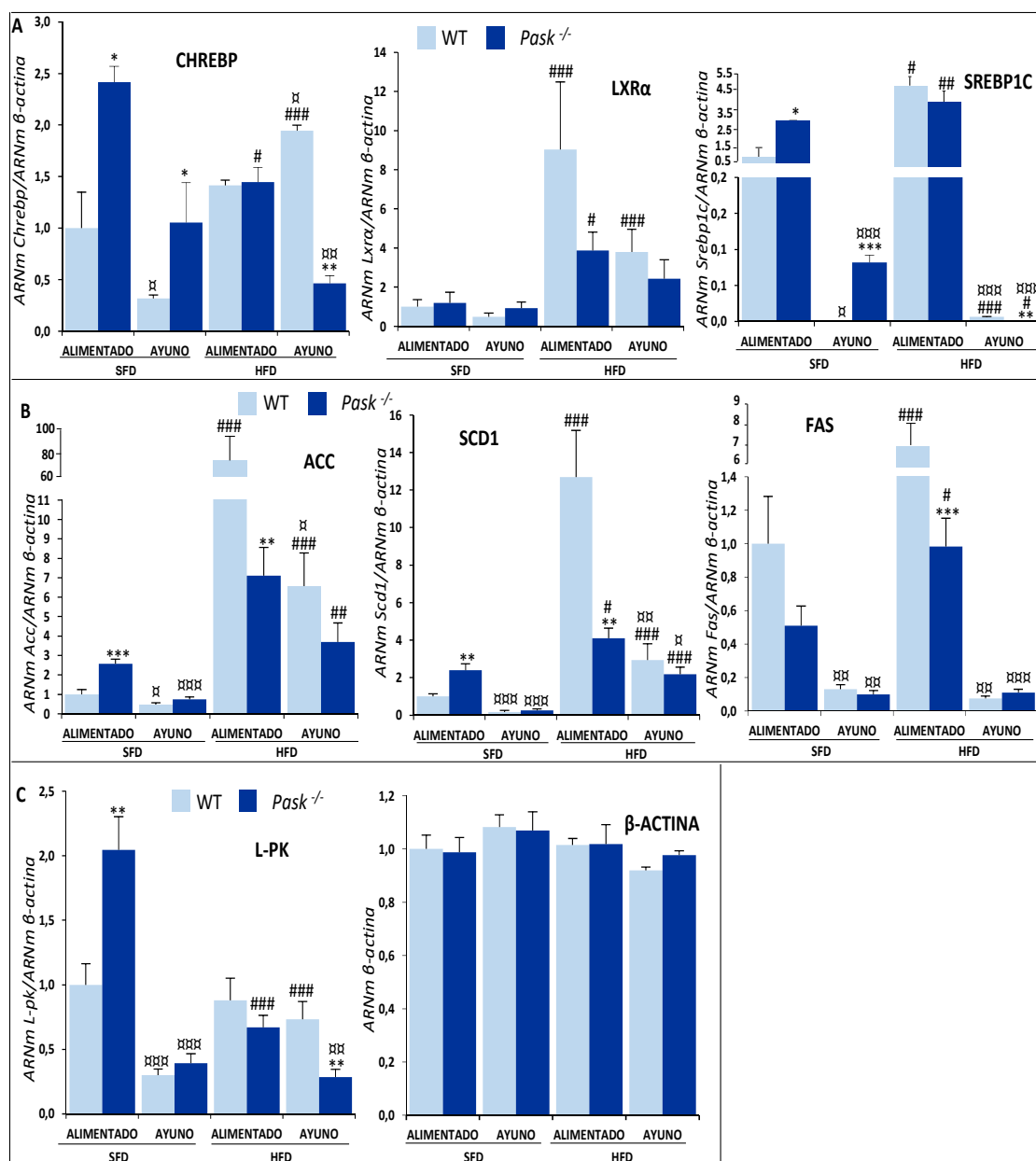


Figura 45. Ratones deficientes en PASK están protegidos de las alteraciones de la expresión de genes metabólicos provocada por HFD en respuesta a ayuno/alimentación. Los niveles de ARNm del hígado de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) alimentados con dieta estándar (SFD) y dieta rica en grasa (HFD) en estado basal de alimentación y ayuno (48h) fueron medidos mediante qRT-PCR y normalizados con *β-actina*. El valor obtenido en el WT alimentado con SFD fue tomado como 1. Los resultados son la media ± SEM; n = 5-6 animales por condición. *, *P*<0,05; **, *P*<0,01; ***, *P*<0,001 WT vs. *Pask*^{-/-}; #, *P*<0,05; ##, *P*<0,01; ###, *P*<0,001 SFD vs. HFD; y α, *P*<0,05; αα, *P*<0,01; ααα, *P*<0,001 alimentado vs. ayuno.

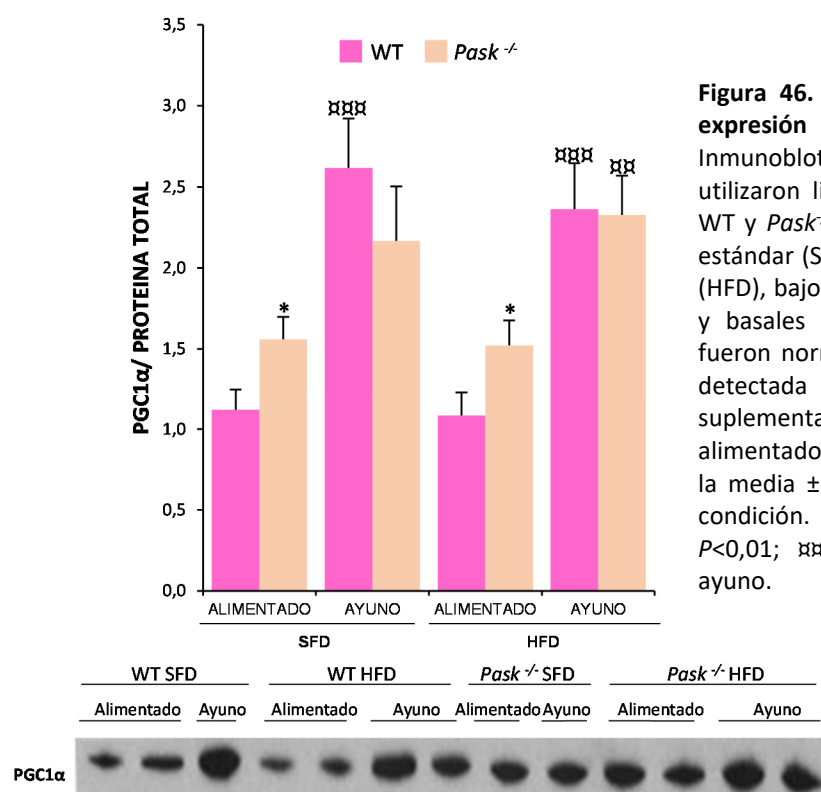
Un efecto similar se observó en los genes estimulados por alimentación con SFD como el *Lxrα*, *Srebp1c*, *Acc*, *Fas* y *Scd1* que se encontraron sobreexpresados en ratones WT con

HFD: 5x *Srebp1c*, 9x *Lxra*, 77x *Acc1* 7x *Fas*, 12x *Scd1* con respecto a SFD, mientras que la deficiencia de PASK revirtió también este efecto. Al igual que describimos con los genes estimulados por ayuno, la HFD desregula los genes estimulados por alimentación como *Lxra*, *Srebp1c*, *Chrebp*, *Acc* y *Scd1* que aumentaron su expresión también en condiciones de ayuno en ratones WT (**Figura 45**).

9.2 La expresión de la proteína PEPCK fue alterada con HFD

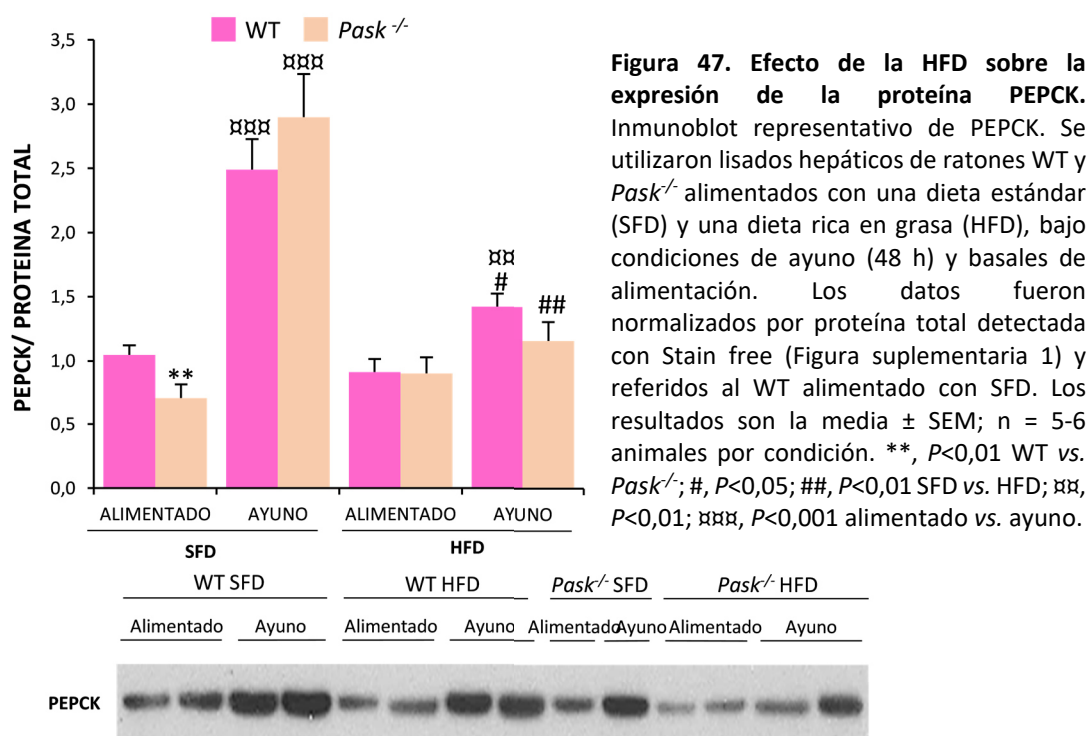
Para estudiar el efecto de HFD sobre PGC1 α y PEPCK se realizaron Western Blot utilizando lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK que habían sido alimentados con SFD y HFD, bajo condiciones de ayuno (48 h) y alimentación.

La HFD no alteró significativamente los niveles de PGC1 α en ratones WT y deficientes en PASK (**Figura 46**). No obstante, los ratones *Pask*^{-/-} presentaron una mayor expresión de PGC1 α en condiciones de alimentación con ambos tipos de dieta.



Resultados

La HFD provocó una disminución de la expresión de la proteína PEPCK en condiciones de ayuno con respecto a SFD en ambos ratones, WT y *Pask*^{-/-}. Sin embargo, en los ratones controles alimentados con HFD el ayuno aún incrementa la expresión de la PEPCK con respecto a alimentación, mientras que este efecto no se observó en ratones *Pask*^{-/-} (Figura 47).



9.3 HFD alteró la señalización de la insulina en respuesta a ayuno/alimentación

Los niveles de insulina en sangre se ven alterados con la obesidad. La insulina es esencial para la activación de esta ruta, en la cual la proteína Akt es una de las enzimas fundamentales. La actividad de la ruta es también regulada por la fosfatasa PTEN.

Para analizar el efecto de HFD sobre la regulación de esta vía, llevamos a cabo Western Blot utilizando los lisados hepáticos de ratones WT y deficientes en PASK que habían sido alimentados con SFD o HFD, bajo condiciones de alimentación y de ayuno (48 h).

Los niveles de la proteína Akt total aumentaron con HFD en ambos tipos de ratones (Figura 48A). La activación de esta proteína se estudió analizando la expresión de P-Akt (Ser-473). HFD provocó un aumento en los niveles de P-Akt en ambos tipos de ratones. En los ratones WT, HFD alteró la regulación por ayuno/alimentación de esta vía. Por lo tanto, la inhibición de esta vía en condiciones de ayuno prolongado con SFD no se produjo con HFD y la vía está sobreactivada en condiciones de ayuno y alimentación. Sin embargo, en ratones *Pask*^{-/-} esta alteración se observó con ambos tipos de dietas, es decir, Akt fue activada de forma independiente al tipo de dieta y a las condiciones metabólicas (Figura 48B).

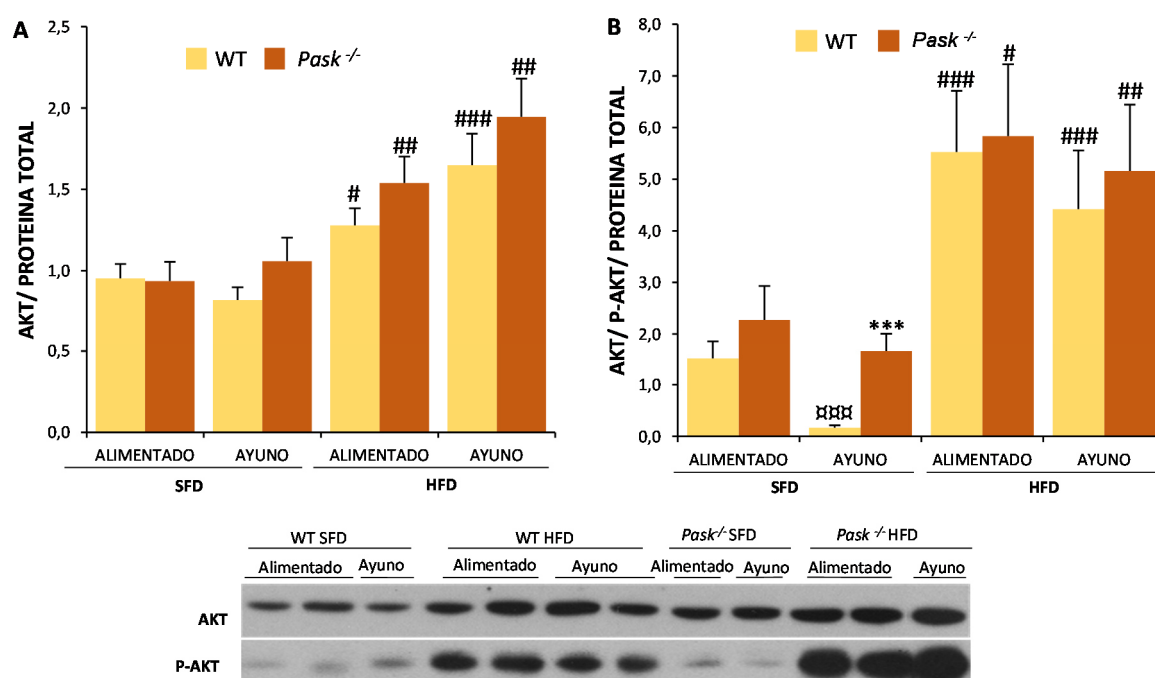


Figura 48. Alteración de la señalización de la insulina provocada por HFD. Inmunoblot representativo de Akt y P-Akt (Ser-473). Se utilizaron lisados hepáticos de ratones WT y *Pask*^{-/-} alimentados con una dieta estándar (SFD) y una dieta rica en grasa (HFD), bajo condiciones de ayuno (48 h) o basales de alimentación. Los datos fueron normalizados por proteína total detectada con Stain free (Figura suplementaria 1) y referidos al WT alimentado con SFD. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; #, $P < 0,05$; ##, $P < 0,01$; ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD; ###, $P < 0,001$ alimentado vs. ayuno.

Resultados

La ruta PI3K/Akt está regulada por la fosfatasa PTEN que la inactiva e inhibe. HFD produjo una ligera disminución en la expresión de PTEN en condiciones de alimentación tanto en ratones WT como deficientes en PASK con respecto a SFD. En ratones WT, el efecto inhibitorio del ayuno sobre la expresión de esta proteína se observó con ambos tipo de dieta, sin embargo, en ratones *Pask*^{-/-} este efecto se perdió con HFD (**Figura 49**).

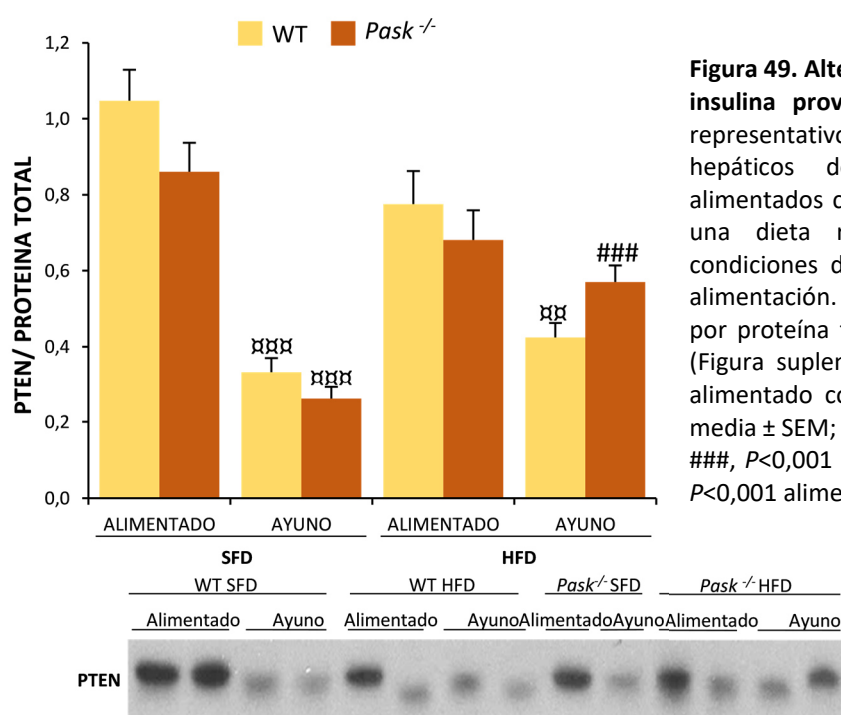


Figura 49. Alteración de la señalización de la insulina provocada por HFD. Inmunoblot representativo de PTEN. Se utilizaron lisados hepáticos de ratones WT y *Pask*^{-/-} alimentados con una dieta estándar (SFD) y una dieta rica en grasa (HFD), bajo condiciones de ayuno (48 h) o basales de alimentación. Los datos fueron normalizados por proteína total detectada con Stain free (Figura suplementaria 1) y referidos al WT alimentado con SFD. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD; αα, $P < 0,01$; ααα, $P < 0,001$ alimentado vs. ayuno.

10 LA MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE microARN (miARN) POR HFD FUE DEPENDIENTE DE PASK

Los miARN son pequeñas moléculas no codificantes que llevan a cabo el silenciamiento del ARNm mediante su escisión, inhibición de la traducción o degradación en el citoplasma.

Tienen un papel importante a nivel metabólico, ya que están implicados en la regulación de la secreción de insulina y en la regulación del metabolismo de glucosa y de lípidos.

Nosotros llevamos a cabo el análisis de miR-33a y miR-143, implicados en el metabolismo de colesterol y ácidos grasos y en la homeostasis de glucosa, respectivamente [121, 122]. Para llevar a cabo este análisis, realizamos RT-PCR para medir los niveles de ARNm en hígado de ratones WT y deficientes en PASK alimentados con SFD o HFD, en condiciones de alimentación y ayuno (48 h).

HFD altera los mecanismos reguladores que controlan la expresión de *miR-33a* y *miR-143*.

En ratones WT, la expresión de *miR-33a* disminuyó con HFD en ambas condiciones con respecto a SFD, siendo significativo en condiciones de ayuno. Por el contrario, en ratones *Pask*^{-/-} su expresión aumentó con HFD tanto en ayuno como en alimentación (**Figura 50A**).

Los ratones WT alimentados con HFD, presentaron niveles de *miR-143* similares en ayuno y en alimentación. Sin embargo, los ratones deficientes en PASK si modificaron el patrón de expresión de *miR-143* en respuesta a situaciones de ayuno/alimentación, con una expresión significativamente mayor en situaciones de ayuno con respecto a alimentación con HFD (**Figura 50B**).

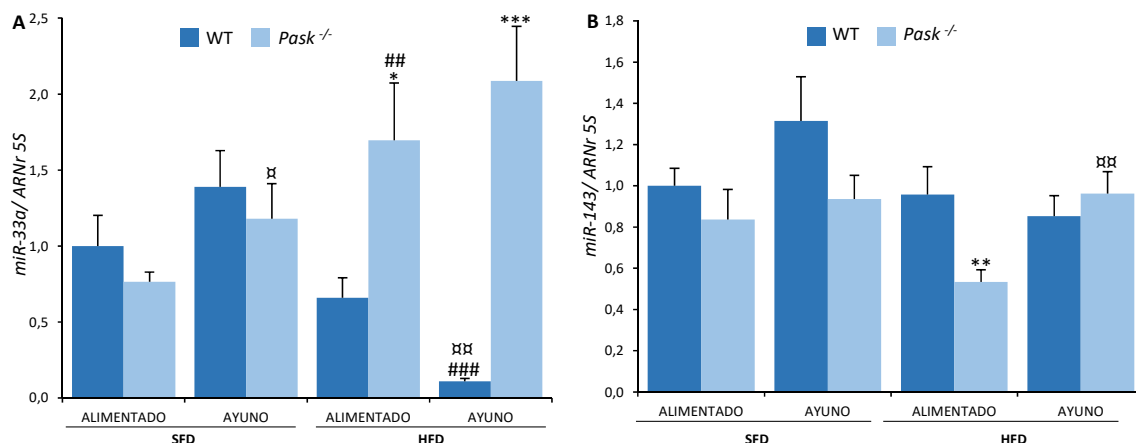


Figura 50. Regulación de la expresión de miARNs por HFD. RT-PCR de *miR-33a* (A) y *miR-143* (B). Se analizaron los niveles de miARN de ratones WT y deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) alimentados con dieta estándar (SFD) y dieta rica en grasa (HFD) en condiciones basales de alimentación o ayuno (48 h). Los datos fueron normalizados con ARNr5S. El valor obtenido en el WT alimentado con SFD fue tomado como 1. Los resultados son la media \pm SEM; n = 5-6 animales por condición. **A y B.** *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}; ##, $P < 0,01$; ###, $P < 0,001$ SFD vs. HFD; y α, $P < 0,05$; αα, $P < 0,01$ alimentado vs. ayuno.

11 EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE PASK Y LA HFD EN EL NÚMERO DE MITOCONDRIAS

La disfunción mitocondrial es uno de los principales defectos provocados por la obesidad y diabetes, a través de la resistencia a insulina y la disfunción de las células β.

Se ha visto que este tipo de dieta provoca una remodelación de la mitocondria dando lugar a un estado más condensado debido al aumento de la densidad de la matriz y de las invaginaciones de la membrana [154]. Este cambio de estado está relacionado con el estado energético de la mitocondria, indicando que la mitocondria está energéticamente más activa.

Se realizaron fotos con microscopía electrónica para analizar la morfología de los componentes celulares y se llevó a cabo un recuento del número de mitocondrias en ratones WT y deficientes en PASK alimentados con SFD o HFD.

Se observó que en condiciones de alimentación, los ratones *Pask*^{-/-} poseen menor número de mitocondrias con respecto a ratones WT, en ambos tipos de dieta. La HFD no modificó el número de mitocondrias con respecto a SFD en ratones WT, pero en ratones deficientes en PASK provocó un ligero aumento en el número de mitocondrias (**Figura 51**).

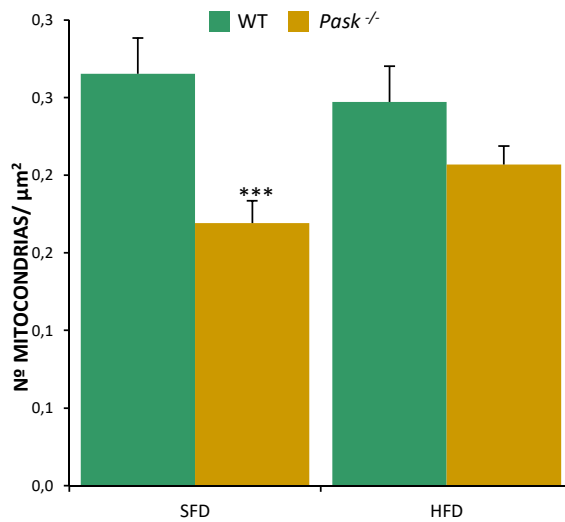


Figura 51. Efecto de la deficiencia de PASK en el número de mitocondrias. Contaje del número de mitocondrias hepáticas en fotos de microscopía electrónica. Se utilizaron hepatocitos de ratones WT y *Pask*^{-/-} alimentados con dieta estándar (SFD) o dieta rica en grasa (HFD). El resultado se obtuvo de dividir el número de mitocondrias de cada hepatocito por el área. Los resultados son la media \pm SEM; n=7 hepatocitos por condición. ***, $P < 0,001$ WT vs. *Pask*^{-/-}.

DISCUSIÓN

El hígado es el principal órgano que mantiene la homeostasis del organismo. Es esencial para la síntesis, metabolismo, almacenamiento y redistribución de los distintos tipos de nutrientes del organismo. Las funciones hepáticas están reguladas hormonalmente por insulina y glucagón promoviendo cambios que permiten la adaptación a periodos de ayuno/alimentación. Por estas razones, elegimos este órgano para llevar a cabo el estudio de los objetivos propuestos en esta tesis.

1 PASK Y EL ESTADO NUTRICIONAL

En estudios previos, se ha descrito que la PASK es una enzima importante para la regulación de la homeostasis metabólica [96] y es activada por glucosa en células β pancreáticas [104]. Sin embargo, existen datos contradictorios acerca de esta regulación por glucosa y la consiguiente liberación de insulina, que podría ser independiente de PASK [155]. Nuestro grupo ha descrito que PASK funciona como un sensor de nutrientes en células del neuroblastoma y en áreas hipotalámicas. Su función en este caso sería similar a otros sensores metabólicos implicados en el mantenimiento de la disponibilidad energética del organismo, como la AMPK (Proteína quinasa activada por AMP) y mTOR (*“Mammalian Target of Rapamycin”*), siendo además regulada por estados nutricionales de ayuno/alimentación. Además, los ratones *Pask*^{-/-} tienen alterada la respuesta de estos dos sensores a ayuno/alimentación, tanto en el hipotálamo como en el hígado [107, 156].

Hay muchos estudios que involucran a AMPK y otros sensores en la adaptación del hígado a ayuno/alimentación, sin embargo, poco se sabe sobre el papel de PASK en esta función del hígado. Por ello, teniendo en cuenta estos datos previos, estudiamos el papel de PASK y otros sensores metabólicos en la adaptación del hígado a la regulación metabólica por ayuno/alimentación.

Discusión

Algunos estudios previos han demostrado que los ratones deficientes en PASK (*Pask*^{-/-}) presentan una resistencia al desarrollo de obesidad y resistencia a insulina provocados por una dieta rica en grasa [111], por lo que resulta un modelo animal útil para el estudio de la regulación metabólica.

En el presente estudio, hemos podido ver que *Pask* se expresa en el hígado y varía según las condiciones metabólicas, siendo suprimida por ayuno y recuperándose cuando los ratones están alimentados *ad libitum* más allá de 3 horas. Se observó, además que 3 h no eran suficientes para esta recuperación, en contradicción con resultados previos de otros grupos, que muestran que la expresión alcanza sus niveles máximos a las 2 h de alimentación, mientras que a las 6 h vuelve a estados similares al ayuno [110], indicando que puede ser debido a una rápida regulación por insulina. Esto estaría indicando que la expresión de *Pask* es dependiente de los tiempos de ayuno y de alimentación y la controversia entre los distintos resultados sería consecuencia de las condiciones experimentales en cada caso: ayunos más o menos prolongados antes de la realimentación, podría ser un condicionante. El hecho de que el ayuno prolongado bloquee la expresión de *Pask*, nos puede hacer pensar que, en estas condiciones, los ratones WT podrían estar remediando los efectos que observamos en *Pask*^{-/-}, aunque hay que tener en mente que la deficiencia en PASK se debe a la carencia del dominio quinasa, no de que no exista dicha proteína.

2 PAPEL DE PASK EN LA ADAPTACIÓN DE LA GCK A AYUNO/ALIMENTACIÓN

Uno de los sensores metabólicos más importante en el hígado es la enzima GCK. Por eso uno de los principales puntos de estudio de esta tesis está centrado en esta enzima y si su regulación esta mediada por la PASK.

La GCK es el principal sensor de glucosa hepático ya que cataliza la primera etapa en el metabolismo de la glucosa, llevando a cabo la fosforilación de glucosa a glucosa-6P. Se encuentra regulada transcripcionalmente por insulina y glucagón, es decir, está influida por periodos de ayuno y alimentación. Pero, también se encuentra regulada postranscripcionalmente mediante interacción con su proteína reguladora (GCKR), según su localización intracelular y el estado metabólico de la célula. En condiciones de ayuno y baja glucosa, la GCK es secuestrada en el núcleo por interacción con la GCKR, mientras que la elevación de glucosa favorece su salida al citoplasma donde ejerce su acción fosforilante de glucosa.

Además, se ha descrito que mutaciones en el gen *Gck* están relacionados con diabetes tipo MODY [157]. De hecho, activadores de la glucoquinasa son utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2 [158] y el aumento de los niveles de la GCK conducen a una disminución en desarrollo de hiperglicemia e hiperinsulinemia provocadas por el consumo de una dieta rica en grasa [159].

Nuestros resultados señalan que los ratones WT presentaron un bloqueo de la expresión del gen *Gck* en condiciones de ayuno tanto a 18 como a 48 h. Sin embargo, la expresión de *Gckr* aumentó durante el ayuno, sólo si es prolongado (48 h). El aumento de la expresión de la proteína reguladora durante periodos largos de baja glucosa se encuentra en concordancia con resultados anteriormente descritos [72, 82, 160], de ahí que optáramos por utilizar ayunos tan prolongados (48 h) a pesar de no ser una situación fisiológica común en el ser humano.

A diferencia de los WT, en los ratones *Pask*^{-/-} ambos genes quedaron bloqueados en el ayuno prolongado. En general, los ratones deficientes en PASK presentan una menor

Discusión

expresión de la enzima GCK tanto a nivel génico como de proteína. Como indicamos antes, la actividad glucoquinasa depende asimismo de la interacción con la GCKR que la mantiene inactiva en el núcleo. Por ello, para estudiar la funcionalidad de GCK en ratones *Pask*^{-/-} y si ésta se encuentra disminuida al igual que la proteína y la expresión, analizamos la localización intracelular y la actividad glucoquinasa. Los estudios inmunohistoquímicos realizados indicaron que, en ratones WT, la GCK en estado basal se encuentra localizada en el citoplasma mientras que en los ratones deficientes en PASK se encuentra en el núcleo, al igual que en condiciones de ayuno, siendo menos activa que en ratones controles. Además, los ratones *Pask*^{-/-} presentaron una menor actividad glucoquinasa tanto en condiciones basales como de realimentación, lo que se mantiene en concordancia con los resultados anteriormente mencionados.

Resultados previos de nuestro laboratorio, indican que el sensor energético AMPK se encuentra sobreactivado en estos ratones deficientes en PASK, alterando su respuesta a ayuno/alimentación [107]. Investigaciones previas [85] muestran que la fosforilación por AMPK de la GCKR y de una proteína citosólica de unión a GCK, la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfato, disminuye la fosforilación de la glucosa y la translocación de la GCK del núcleo al citoplasma. Esto puede ser consistente con la menor actividad de la proteína GCK y la menor localización en el citoplasma durante condiciones de alimentación en los ratones *Pask*^{-/-}.

3 PAPEL DE PASK EN LA ADAPTACIÓN A CAMBIOS NUTRICIONALES

Los mecanismos de adaptación a cambios nutricionales en el hígado tienen lugar mediante la regulación de diferentes rutas metabólicas tales como la síntesis y degradación de glucógeno, gluconeogénesis, glucolisis y la síntesis o degradación de ácidos grasos. El

proceso de adaptación se desencadena por las respuestas hormonales originadas por los niveles circulantes de glucosa. Todas estas acciones son controladas por la activación/inhibición de factores de transcripción que regulan proteínas claves de las rutas mencionadas.

Durante el ayuno, se secreta glucagón debido a los bajos niveles de glucosa en sangre. En el hígado, esto promueve las rutas de la glucogenolisis y a más largo plazo la gluconeogénesis. Por el contrario, en periodos postprandiales, cuando los niveles de glucosa son altos, se secreta insulina que estimula la vía glucolítica, y el exceso de nutrientes puede convertirse en ácidos grasos y triglicéridos.

Estudios previos señalan que PASK tiene un papel en el metabolismo de glucosa y de lípidos. A nivel pancreático regula positivamente la secreción de insulina, actuando a través del factor de transcripción PDX1 (*“pancreatic and duodenal homeobox 1”*), mientras que inhibe la de glucagón, asimismo controla a las enzimas Glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) y la Glucógeno sintasa (GS) regulando la acumulación de glucógeno [103, 105, 109]. En cuanto al metabolismo lipídico, es necesaria para la maduración de la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP1c) y, en consecuencia, para la expresión de *Acc* (Acetil-CoA carboxilasa) y *Fas* (Ácido graso sintasa), genes implicados en lipogénesis *de novo* [161].

Debido a la información ya publicada sobre PASK y su papel en el metabolismo, nos propusimos analizar cómo la deficiencia de PASK puede afectar a la regulación por ayuno/alimentación tanto de los factores de transcripción como de las enzimas claves que regulan las rutas metabólicas anteriormente mencionadas.

Discusión

La ruta de señalización de la insulina tiene como principal intermediario la Akt que se activa mediante fosforilación. Esta ruta tiene gran importancia, ya que la insulina es el principal regulador de los niveles de glucosa en sangre y puede ejercer su acción reguladora sobre una gran cantidad de genes. Investigaciones previas muestran que Akt media la acción de la insulina en la homeostasis de glucosa y lípidos, de este modo, su activación inhibe la gluconeogénesis y activa glucolisis y lipogénesis *de novo* [162]. Los datos obtenidos en nuestra investigación indican que en ratones WT el ayuno bloquea la activación de Akt, mientras que los ratones *Pask*^{-/-} presentan una sobreactivación de la enzima Akt, incluso en condiciones de ayuno, y tienen por lo tanto alterada la regulación de esta vía en situaciones de ayuno/alimentación. Investigaciones previas indicaban que la Akt puede ser desacetilada por SIRT2 favoreciendo su activación por insulina [61]. Esto nos llevó a analizar la expresión del gen *Sirt2*, observando una expresión ligeramente mayor en condiciones de realimentación en los ratones deficientes en PASK.

Al igual que ocurre con SIRT2, la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP), factor de transcripción activado por glucosa, también puede influir en la activación de Akt. Se ha propuesto que ChREBP favorece el efecto de la insulina aumentando la fosforilación de Akt [163]. Este efecto es ejercido a través de la Esteroil-CoA desaturasa (SCD1). Ellos muestran que el incremento en la fosforilación de Akt ocurre de forma independiente a los niveles de insulina, como es el caso de los ratones *Pask*^{-/-}, y esto está relacionado con una mayor sensibilidad a insulina. Nuestros resultados mostraron que la expresión de este factor de transcripción y de esta enzima (ChREBP y SCD1) es mayor en ratones *Pask*^{-/-} que en ratones controles, lo que puede ser otra causa de la sobreactivación de Akt en ratones deficientes en PASK.

Por otro lado, el efecto de la insulina en la lipogénesis *de novo* es llevada a cabo por SREBP1c un factor de transcripción que juega un papel fundamental en el metabolismo lipídico. Es sintetizado como precursor en el retículo endoplásmico y es transformado a su forma madura mediante una escisión proteolítica provocando su translocación al núcleo. El efecto de la insulina sobre la lipogénesis hepática es dependiente tanto de la expresión del gen *Srebp1*, como de la activación proteolítica del precursor [164-166]. Asimismo, la insulina impide la degradación de las formas maduras de SREBP1 [167].

De acuerdo con estos datos, en los ratones WT la activación de SREBP1 y la activación de Akt están correlacionados, bloqueados en condiciones de ayuno, recuperándose tras las 3 h de realimentación a valores por encima de los basales. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los ratones deficientes en PASK presentan una mayor expresión del gen *Srebp1c* en todas las condiciones analizadas con respecto a los controles. Estos datos coinciden con la sobreactivación de Akt que previamente se ha relacionado con incrementos de la expresión de SREBP1 [168]. Sin embargo, contradicen en parte los resultados previos [110], que indicaban que la PASK es necesaria para la expresión de SREBP1 y su maduración.

Para aclarar la contradicción de nuestros resultados con los anteriormente publicados en los que encontraban menores niveles de SREBP1c maduro en los ratones deficientes en PASK, analizamos si existían diferencias de expresión entre el precursor y la forma nuclear madura de este factor de transcripción, analizando los niveles de proteína citosólica y nuclear por separado. Los resultados obtenidos indican que los niveles del precursor siguen siendo ligeramente mayores en ratones deficientes en PASK. Sin embargo, los niveles de la forma activa nuclear son mayores en ratones WT en condiciones basales y de

Discusión

realimentación disminuyendo en ayuno, pero el efecto de la realimentación no se observa en ratones *Pask*^{-/-}.

Investigaciones previas demuestran que los niveles de proteína del precursor de SREBP1c disminuyen tras 24 h de ayuno y que una realimentación de 12 h aumenta los niveles de nuevo hasta los alcanzados en la condición basal [49]. Los datos mostrados en esta tesis ofrecen el mismo patrón de expresión de proteína del precursor a pesar de las variaciones en los tiempos. En cuanto a la forma nuclear, también indican una bajada en el ayuno y que los efectos de la realimentación empiezan a ser notables a partir de las 3 h. Experimentos posteriores realizados en cultivos de hepatocitos muestran que el efecto de la insulina sobre la maduración de SREBP1c es significativo a partir de las 4 h y que los valores máximos se alcanzan a las 6 h [169]. Nuestros ratones controles a las 3 h de realimentación sí muestran un aumento significativo con respecto al ayuno, pero en los deficientes en PASK este efecto no es notable en ese tiempo de realimentación.

La alimentación, además de aumentar la expresión de Akt, induce el aumento de la expresión de ciertos factores de transcripción reguladores del metabolismo lipídico tales como el receptor X hepático (LXR), el receptor activado por proliferadores perioxosomales y (PPAR γ) y ChREBP. Estos factores se han descrito como inductores de la expresión de SREBP1c [39, 170, 171]. A diferencia de la insulina, la activación por LXR da lugar al aumento de la expresión del gen y la proteína del precursor de SREBP1c, pero tiene poco efecto en la inducción de la forma madura [166]. Nosotros mostramos que los ratones *Pask*^{-/-} presentan una expresión mayor de estos genes en todas las condiciones analizadas con respecto a los ratones controles, al igual que ocurre con el *Srebp1c*. Por lo tanto, podemos concluir que los ratones deficientes en PASK presentan una mayor expresión de factores que han sido

demostrados ser potentes activadores de SREBP1c, lo que podría ser una explicación a la mayor expresión de este gen.

El SREBP1 es un inductor clave de genes de enzimas lipogénicas [7]. Los resultados aquí mostrados señalan que, en ratones WT, la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos *Acc*, *Fas* y *Scd1* se estimula después de la realimentación, mientras que en los *Pask*^{-/-} permanece en valores similares al ayuno. Estos datos están en concordancia con el aumento de los niveles de la forma madura del SREBP1c en ratones WT, y corroboran la información previamente publicada [110], que indica que la deficiencia de PASK disminuye la expresión de genes lipogénicos.

Además, nuestros datos también muestran que SREBP1c podría limitar la expresión de la GCK en el hígado de ratones *Pask*^{-/-} realimentados, pero de acuerdo con estudios previos no es crítico para su expresión [170, 172]. Ello explicaría que la expresión de la GCK encontrada en los ratones *Pask*^{-/-} en estas condiciones tienda a ser menor.

Asimismo, también hay investigaciones que indican que ChREBP es necesario para regular la expresión del gen de la L-PK, enzima perteneciente a la ruta de la glucólisis [173], además de *Acc* y *Scd1* [163]. Nosotros podemos observar que el gen de la L-PK se encuentra activado por alimentación y su expresión es mayor en ratones *Pask*^{-/-} que en ratones controles, mostrando un patrón de expresión similar al de *Chrebp*.

Por tanto, nuestros datos confirman una expresión menor de las enzimas lipogénicas en ratones deficientes en PASK y apoyan el hecho de que PASK tiene un importante papel en el metabolismo de lipídico hepático y es requerida para una acción efectiva de la insulina sobre la maduración proteolítica de SREBP1c.

Discusión

Durante periodos de ayuno, cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, tiene lugar la gluconeogénesis, principal vía hepática para mantener los niveles de glucosa en sangre durante ayunos prolongados, y la β -oxidación de ácidos grasos. Nuestros resultados señalan que ratones WT en condiciones de ayuno presentan un aumento de la expresión de los genes de los factores de transcripción *Pgc1 α* (Coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ), *Foxo1* (“Forkhead O box 1”) y *Ppara*. Ellos regulan la expresión de las enzimas claves *Pepck* (Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), *G6Pasa* (Glucosa 6-fosfatasa) y *Cpt1 α* (Carnitina palmitoil transferasa) que controlan estas vías metabólicas. Durante el ayuno, aumenta la expresión de *Foxo1* que activa a las enzimas gluconeogénicas, *Pepck* y *G6Pasa* [174], mientras que inhibe a la *Gck* [74, 175]. Sin embargo, los ratones *Pask*^{-/-} presentan cambios en los niveles de expresión de genes activados por ayuno disminuyendo *Foxo1* y *Cpt1 α* , mientras que la expresión de *Ppara* aumenta. Estos datos quizás respondan a la sobreactivación observada en Akt, ya que ésta fosforila e inhibe a FOXO1 [22, 28].

En los resultados obtenidos podemos ver una expresión mayor del *Pgc1 α* en ratones *Pask*^{-/-} que en ratones controles. Estudios previos llevados a cabo en el músculo, no muestran diferencias en los niveles de expresión de *Pgc1 α* entre ambos tipos de ratones, lo que podría ser debido a que existe una respuesta específica de tejido [111]. Por otro lado, existen evidencias de que, en hepatocitos primarios, PGC1 α se encuentra bajo el control transcripcional de PPAR α [176], cuyo gen también presenta una expresión mayor en ratones *Pask*^{-/-} que en ratones controles.

En ratones WT, la PEPCK aumenta en el ayuno y tras la realimentación baja a valores similares a la condición basal. Los ratones *Pask*^{-/-} presenta una mayor expresión a nivel

proteico en condiciones de ayuno y tras la realimentación. Sin embargo, a nivel génico la expresión es más baja en estos ratones. Existen evidencias de que la acetilación está relacionada con una disminución en los niveles de proteína de PEPCK, ya que aumenta su ubiquitinación y degradación, mientras que la desacetilación por SIRT2 aumenta su estabilidad [177-179]. Esto se correlaciona con la ligera sobreexpresión de *Sirt2* en ratones *Pask*^{-/-} tanto en ayuno como en realimentación.

La diferencia de expresión entre el gen y la proteína de un mismo enzima o factor de transcripción puede ser debida a modificaciones postraduccionales, ya que éstas pueden afectar a su estabilidad, vida media o localización celular.

En resumen, podemos decir que los factores de transcripción y enzimas importantes del metabolismo se encuentran regulados por las variaciones fisiológicas que se producen durante el ayuno y la alimentación. Al ser PASK un sensor de nutrientes en el hígado y tener un papel en la homeostasis de glucosa y secreción de insulina, su deficiencia afecta a la regulación por ayuno/alimentación de estos factores y enzimas metabólicos.

4 EFECTO DE LA EXENDINA-4 (Ex4) Y PASK EN LA ADAPTACIÓN A CAMBIOS NUTRICIONALES

El GLP-1 es una incretina de vida media corta que es liberada postprandialmente, ejerciendo sus acciones insulino-trópicas y glucagonostáticas, es decir, potencia la secreción de insulina e inhibe la de glucagón. Por ello la Ex4 (análogo del GLP-1 con mayor vida media) ha sido utilizada en la clínica para el tratamiento contra la diabetes.

En estudios llevados a cabo en este laboratorio se ha descrito que, en células N2A, PASK es una enzima que juega un papel importante en las acciones del GLP-1 [180]. Además, se ha podido comprobar que, en áreas hipotálamicas y en hígado, el GLP-1/Ex4 revierte el

Discusión

efecto de la glucosa sobre los reguladores energéticos AMPK y P70S6K y modula su actividad en alteraciones metabólicas como obesidad o resistencia a insulina [107, 152].

Debido a los resultados previamente vistos en células y áreas hipotalámicas, centramos uno de los objetivos de la tesis en el estudio del efecto de la Ex4 sobre la regulación por ayuno/alimentación de diferentes sensores y reguladores metabólicos a nivel hepático.

En células N2A, la expresión de *Pask* disminuye en presencia de GLP-1, a bajas concentraciones de glucosa [180]. En los datos presentados en estos estudios, también hemos podido comprobar que en el hígado la expresión de *Pask* disminuye o queda bloqueada por Ex4 en todas las condiciones analizadas. Esto podría afectar en su acción sobre ciertos sensores y reguladores hepáticos.

Asimismo, observamos que la expresión del receptor de GLP-1 en hígado (*Glp1r*) en ratones WT se encuentra bloqueada por el ayuno, sin embargo, en los ratones deficientes en PASK no se observa este efecto, por lo tanto presentan una alteración en la regulación de la expresión de *Glp1r*. Esto podría influir en la acción de la Ex4 sobre los reguladores metabólicos. Estudios previos señalan que ratones heterocigotos para GLP1-R (*GLP1-R^{+/-}*) tienen alterada la glucemia y en consecuencia los niveles de insulina en sangre, pero no tienen afectado los niveles de glucagón [181]. Sin embargo, en ratones *Pask^{-/-}* se ha descrito que el efecto de la Ex4 en los niveles de circulantes de glucosa fue menor que en WT, tanto en condiciones de ayuno como de alimentación [107].

Nuestros resultados indican que la Ex4 disminuyó los niveles de proteína GCK en ratones WT en condiciones basales. Por el contrario, la deficiencia de PASK revierte este efecto aumentando su expresión, siendo el efecto máximo en ayuno. Sin embargo, la Ex4

provoca una disminución de la actividad glucoquinasa y de la expresión génica en condiciones de realimentación tanto en ratones *Pask*^{-/-} como en controles. Datos anteriores de nuestro laboratorio muestran que el efecto de la Ex4 sobre la proteína AMPK, a nivel hepático, también es diferente en ratones WT y *Pask*^{-/-} [107]. En áreas cerebrales, la GCK y el GLP1-R se expresan en las mismas células involucradas en la ingesta. La administración de GLP-1 reduce el metabolismo cerebral de glucosa, pudiendo influir sobre las células que contienen GCK [182]. Otros autores indican que la presencia de Ex4 incrementa la actividad glucoquinasa en el hígado [183]. En ese caso existen variaciones experimentales con respecto a nuestros datos, ya que la duración del tratamiento con Ex4 es de 30 minutos, mientras que el nuestro es de 3 h, pudiendo tener un mayor efecto a corto plazo.

Al igual que ocurre en ausencia de Ex4, los ratones WT presentan un bloqueo de la activación de Akt por ayuno en presencia de Ex4, mientras que los ratones *Pask*^{-/-} presentan una sobreexpresión de la Akt activada con alteración de la regulación por ayuno/alimentación. La Ex4 tiende a disminuir ligeramente la expresión, siendo significativa en condiciones basales en ambos tipos de ratones. Los estudios previos de nuestro laboratorio en células de neuroblastoma también muestran que la Ex4 provoca una disminución de la proteína Akt fosforilada y activa tanto a alta como a baja glucosa [108]. En ratones controles, la Ex4 disminuye de forma significativa los niveles de Akt activa en condiciones de alimentación prolongada, al igual que sucede con la GCK. En los ratones *Pask*^{-/-}, este efecto se pierde en el caso de la GCK, sin embargo, la Akt activa también disminuye en esta condición. Investigaciones previas de nuestro laboratorio muestran que la Ex4 revierte el efecto de la alimentación sobre la actividad de la proteína AMPK en ratones controles, sin embargo, en ratones *Pask*^{-/-} no se observó este efecto [107]. Esto podría

Discusión

indicar que la Ex4 podría tener un efecto similar sobre la GCK y P-Akt en ratones WT en condiciones de alimentación, revertiendo el efecto cuando la glucosa está alta.

El efecto que la Ex4 tiene sobre la fosfatasa PTEN, regulador negativo de la vía, en ratones WT y deficientes en PASK es el contrario al que ejerce sobre la P-Akt, ya que presenta una ligera tendencia a aumentar su expresión. Esto tiene sentido, ya que se trata de un inhibidor de la ruta. En células del neuroblastoma, se observó un ligero aumento de esta fosfatasa en presencia de Ex4 a baja glucosa, pero no llegó a ser significativo [108].

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que la Ex4 bloquea o disminuye la expresión de la mayoría de los factores transcripción y enzimas implicados en las principales rutas metabólicas hepáticas tanto en ratones WT como *Pask*^{-/-}.

Existen datos previos que demuestran que, en cultivo de hepatocitos de ratones mantenidos *ad libitum*, la Ex4 produce una disminución en la expresión de las enzimas o factores de transcripción relacionados con la síntesis de ácidos grasos como es el caso de *Srebp1c*, *Acc* y *Scd1* y un aumento de los implicados en la β -oxidación como el *Ppara* [148]. En los experimentos que nosotros llevamos a cabo *in vivo*, la Ex4 también disminuye la expresión de *Srebp1c*, *Scd1* y *Acc* en ambos tipos de ratones en las condiciones descritas, sin embargo, no se produce un aumento del *Ppara*. Las variaciones en el tratamiento podrían influir sobre la expresión de este factor de transcripción.

Otras investigaciones señalan que, en células β pancreáticas, la Ex4 inhibe la expresión de *Srebp1c* y de *Akt*. Además, también añaden que este antidiabetogénico puede inhibir la translocación del SREBP1c al núcleo para convertirse a su forma activa y esta acción la realiza a través de la vía PI3K/Akt [184]. Esto podría correlacionarse, a nivel hepático, con la

disminución de la expresión de este factor de transcripción y esta enzima en presencia de Ex4, ejerciendo una acción protectora.

En células del neuroblastoma silenciadas para PASK no se observan diferencias significativas en el efecto de la Ex4 sobre el PGC1 α a baja y alta glucosa [108]. A nivel hepático, ambos tipos de ratones muestran un descenso de la expresión de *Pgc1 α* en presencia de Ex4 en condiciones basales. Esto se correlaciona con la disminución en la expresión de *Foxo1* en las mismas condiciones, ya que actúan de forma conjunta [12]

Teniendo todos estos datos en cuenta, podríamos decir que la Ex4 parece alterar la regulación por ayuno/alimentación de los genes de factores de transcripción y enzimas metabólicas. Sin embargo, la deficiencia de PASK no interfiere en la acción de este análogo del GLP-1 sobre la mayor parte de los componentes de las rutas metabólicas.

5 PAPEL DE LA PASK EN LA ADAPTACIÓN AYUNO/ALIMENTACION CON HFD

La obesidad es un desorden alimentario que está aumentando alarmantemente en los últimos tiempos y que puede desencadenar consecuencias importantes en el organismo. Se produce por una alteración en el metabolismo debido a que la ingesta de energía supera al gasto. Puede dar lugar a otras alteraciones tales como diabetes tipo 2, resistencia a insulina, síndrome metabólico y esteatosis hepática o hígado graso (NAFLD) que va acompañado de fibrosis y puede culminar en cirrosis o cáncer hepático. Por lo tanto, el hígado es una de los principales órganos afectados cuando la obesidad se desarrolla debido a una ingesta alta en grasa.

Como indicamos anteriormente, se ha demostrado que los ratones deficientes en PASK presentan una protección al desarrollo de obesidad y de resistencia a insulina provocados por una dieta rica en grasa. Además, son resistentes a las alteraciones

Discusión

provocadas por la obesidad ya que tienen una mejor tolerancia a glucosa y una mayor sensibilidad a insulina que los controles y una menor ganancia de peso tras ser alimentados con HFD durante 8 semanas [111]. Sin embargo, posteriormente, se ha descrito que personas que padecen diabetes tipo 2 presentan una baja expresión de PASK en los islotes pancreáticos [103].

Dada la existencia de estos datos previos, decidimos investigar los efectos de la dieta estándar (SFD) y la dieta rica en grasa (HFD) durante 12 semanas en los ratones WT y *Pask*^{-/-}, para comprobar los efectos que la HFD tiene sobre el organismo y analizar el mecanismo de resistencia a la obesidad de los ratones deficientes en PASK. Los ratones *Pask*^{-/-} presentan un menor aumento de peso y una mejor tolerancia a glucosa y sensibilidad a insulina que los controles cuando son alimentados con HFD. Además, los valores de glucosa en sangre se mantienen en concentraciones similares a las de los ratones controles alimentados con SFD y muestran también mejoras del perfil lipídico. Así, se produce disminución de los niveles de colesterol aunque no de triglicéridos, a diferencia de lo que indican otros estudios [111] que muestran que los niveles de triglicéridos son más bajos en los ratones *Pask*^{-/-} a las 8 h de ayuno, mientras que nosotros lo analizamos en condiciones basales. Por lo tanto, los ratones deficientes en PASK presentan una mejora de los efectos producidos por la HFD.

Asimismo, la ingesta de una dieta rica en grasa conlleva la acumulación de lípidos en los hepatocitos (un indicio de esteatosis hepática); esto da lugar a estrés oxidativo, disfunción mitocondrial e inflamación, teniendo como última consecuencia el daño hepático y fibrosis. Todos estos síntomas se encuentran dentro del espectro de causas que conducen al desarrollo de NAFLD [185-187]. Nuestros datos confirman, que los ratones

deficientes en PASK presentan una menor acumulación de lípidos tras la alimentación con HFD, lo que apoya lo dicho por Hao y cols. [111].

Una vez corroborados estos datos y teniendo en cuenta el hecho de que PASK ha sido propuesta como una diana terapéutica, centramos otro de los objetivos de esta tesis en comparar los mecanismos de adaptación del hígado de ratones *Pask*^{-/-} al tipo de dieta en su regulación por estados nutricionales y ver el papel de PASK en la resistencia a la obesidad.

Nuestros resultados muestran que una de las consecuencias a largo plazo de HFD es una alteración de la respuesta del hígado en su adaptación a las situaciones de ayuno y alimentación.

En primer lugar observamos que la regulación de PASK por estados de ayuno/alimentación se encuentra alterada con la dieta HFD, ya que el ayuno en SFD provoca un bloqueo de la expresión, mientras que con HFD no se observa este efecto. Esta alteración puede influir en el efecto de la HFD sobre otros sensores metabólicos y podría ser responsable de algunos de los cambios metabólicos que se producen. Sin embargo, investigaciones previas indicaban que la expresión de *Pask* aumenta durante la alimentación con HFD en condiciones de realimentación con respecto al ayuno [110]. En estos experimentos existen 2 diferencias metodológicas con respecto a los nuestros: el periodo de duración de la dieta varía de 8 a 12 semanas y el contenido en grasa varía de 60 a 45%. Además, los ayunos que ellos utilizan son de 24 h mientras que los nuestros son de 48 h.

La HFD tiene un drástico efecto sobre la expresión de factores de transcripción que regulan la adaptación a los cambios que se producen durante el ayuno y la alimentación. Por ejemplo, los genes estimulados por el ayuno con SFD (*Foxo1*, *Pgc1α* y *Ppara*), que

Discusión

promueven las enzimas gluconeogénicas (*Pepck* y *G6Pasa*), y genes implicados en la β -oxidación (*M-cad*) están estimulados además en condiciones de alimentación con HFD. Asimismo, condiciones de ayuno con HFD promueven la expresión de genes que se expresan sólo en condiciones de alimentación con SFD (*Chrebp*, *Lxra*, *Srebp1c*, *Ppar γ* , *Acc*, *Fas* y *Scd1*). Estos resultados podrían indicar una alteración de la regulación metabólica y de los niveles de glucosa e insulina y glucagón en sangre, dando lugar al desarrollo de obesidad y enfermedades asociadas.

La deficiencia de PASK bloquea o disminuye la alteración provocada por HFD, evitando la sobreexpresión de los genes. Nuestros datos muestran que, en condiciones de ayuno, los niveles de factores de transcripción activados por alimentación como *Lxra*, *Chrebp*, *Ppar γ* y *Srebp1c* tras la alimentación con HFD, se mantiene en valores similares a los de SFD en ratones *Pask*^{-/-}. Estos resultados pueden contribuir a la resistencia al desarrollo de obesidad en estos ratones. Diferentes investigaciones previas indican que el aumento de los niveles de ARNm de *Ppar γ* contribuye al desarrollo de esteatosis hepática y que existe una correlación entre la expresión de *Ppar γ* y *Srebp1c* de pacientes obesos [188, 189]. Asimismo, hay datos que indican que *Lxra* se encuentra sobreexpresado en el hígado de pacientes con NAFLD y tiene un papel importante en la regulación del metabolismo de lípidos en esta enfermedad [190]. Además, se ha descrito que ChREBP juega un papel importante en el desarrollo de esteatosis hepática y resistencia a insulina en ratones obesos [191]. Por lo tanto, nuestros resultados muestran algunas de las diferencias que pueden explicar cómo los ratones *Pask*^{-/-} están protegidos del desarrollo de obesidad inducida por HFD.

Del mismo modo, la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico y que facilitan la transformación del exceso de carbohidratos a ácidos grasos y triglicéridos, tales como *Fas*, *Acc* y *Scd1*, aumenta de manera muy significativa en ratones WT alimentados con HFD, mientras que en ratones deficientes en PASK los niveles se mantienen de forma similar o con un ligero aumento con respecto a SFD. Este incremento en la expresión de genes implicados en la lipogénesis hepática tales como *Acc*, *Fas* o *Srebp1c* ha sido relacionado con el desarrollo de NAFLD en humanos [192, 193], del cual estarían potencialmente protegidos cuando se carece de PASK funcional.

En nuestros resultados se puede observar que la dieta HFD produce la sobreactivación de la Akt en ambos tipos de ratones, y que conlleva en ratones WT una alteración de la regulación por ayuno/alimentación. Además, en este caso la proteína total también presenta una mayor expresión. Investigaciones previas señalan que el tratamiento con HFD durante 8 semanas conduce al incremento en la fosforilación de Akt [194]. Esto resulta lógico teniendo en cuenta que nuestros resultados muestran que con la HFD ambos tipos de ratones aumenta los niveles de insulina en sangre con respecto a SFD y la activación de esta vía es llevada a cabo por insulina. Por otro lado, la proteína PTEN presenta un aumento significativo de la expresión en ratones *Pask*^{-/-} cuando son alimentados con HFD con respecto a la alimentación con SFD en ayuno, mientras que los ratones controles se mantienen al mismo nivel. Investigaciones previas demuestran que la delección de PTEN puede conducir al desarrollo de hígado graso [195], por lo tanto, la mayor expresión en ratones *Pask*^{-/-} podría tener un efecto protector frente al desarrollo de esta enfermedad.

Nosotros observamos que la HFD produce un aumento de *Foxo1* durante el ayuno con respecto a SFD, sin embargo, disminuye la expresión de las enzimas *Pepck* y *G6Pasa*. La

Discusión

sobreactivación de Akt podría explicar la menor expresión de las enzimas gluconeogénicas, *Pepck* y *G6Pasa*, ya que hay investigaciones que muestran una regulación negativa de estos genes por Akt, que como ya indicamos antes fosforila FOXO1 e impide su translocación al núcleo [28, 196]. Sin embargo, los ratones *Pask*^{-/-} alimentados con HFD presentan una menor expresión de *Pgc1α* con respecto a SFD, en concordancia con la inhibición de FOXO1, lo que explicaría el descenso de las enzimas *Pepck* y *G6Pasa*.

Existen datos que señalan que la β -oxidación de ácidos grasos juega un papel central en el metabolismo y su inhibición puede tener efectos beneficiosos sobre el organismo en respuesta a una dieta rica en grasa [197], resultando en una resistencia al desarrollo de obesidad. En nuestro caso, la HFD produce un aumento de la expresión de *M-cad* en ratones WT con respecto a SFD, sin embargo este aumento no se observó en ratones *Pask*^{-/-}. Por otro lado, la supresión de la β -oxidación conduce a una disminución de la gluconeogénesis, dando lugar a una mejora de la tolerancia a glucosa y de la sensibilidad a insulina, junto con una disminución en el desarrollo de esteatosis hepática provocada por el consumo alto de grasas [197]. La disminución de la expresión de *Cpt1α* con HFD, en ratones WT y *Pask*^{-/-}, podría correlacionarse con la menor expresión de las enzimas claves de la gluconeogénesis en condiciones de ayuno. Este descenso de la expresión de *Pepck* y *G6Pasa* con la dieta HFD es más significativo en ratones *Pask*^{-/-}, lo que puede también explicar la mejora de la homeostasis de glucosa en estos ratones.

Los datos obtenidos en esta tesis señalan que la expresión del gen *Gck* aumenta con la HFD en condiciones de alimentación, sin embargo la expresión de la proteína en esa misma condición disminuye hasta valores similares al ayuno con SFD. La actividad glucoquinasa con HFD disminuye ligeramente en ambos tipos de ratones, pero no de forma

significativa. Estos datos confirman que la actividad GCK es dependiente de muchos mecanismos de regulación (anteriormente descritos). Existen datos contradictorios sobre la regulación de GCK con HFD porque hay investigaciones que indican que HFD puede hipermetilar el promotor de la GCK disminuyendo su expresión y actividad [198], sin embargo, los experimentos realizados por Gorman y cols [199] manifiestan que la HFD aumenta de forma significativa la expresión y la actividad de esta enzima. Ambas investigaciones llevan a cabo el tratamiento durante 8 semanas mientras nosotros lo realizamos durante 12. Por otro lado, la ligera disminución de la expresión de la GCK en los ratones *Pask*^{-/-} podría estar correlacionada con la menor expresión de los genes lipógenicos, ya que una de sus principales funciones es aportar sustratos para la lipogénesis *de novo*.

Considerando todos estos resultados, podríamos decir que la actividad de estos factores de transcripción y enzimas se encuentra alterada por la alimentación rica en grasa y por estados patológicos como obesidad o resistencia a insulina, ya que este tipo de dieta produce una alteración en la respuesta del hígado a la adaptación a ayuno y alimentación. Todos nuestros datos confirman las evidencias de una menor tendencia de los ratones *Pask*^{-/-} a acumular lípidos y que la alimentación alta en grasa no produce una desregulación de los principales factores de transcripción y enzimas claves de las rutas metabólicas hepáticas estudiadas. Esto conlleva a pensar que los ratones *Pask*^{-/-} tienen menos predisposición a padecer NAFLD, por eso la enzima PASK se ha propuesto como una diana para el tratamiento del síndrome metabólico [110].

6 FUNCIÓN DE PASK EN LA REGULACIÓN DE microARNs (miARNs) CON HFD

Los miARNs son importantes reguladores de la expresión de genes a nivel postranscripcional. Hay estudios que indican que la ingesta de grasa puede afectar a su

Discusión

expresión y por tanto al funcionamiento de ciertos tejidos, entre ellos el hígado. Por eso decimos llevar a cabo el análisis de miARNs y ver si la deficiencia de PASK y HFD pueden afectar a su expresión.

Decidimos estudiar la expresión de *miR-33a* y *miR-143* debido a su relación con el metabolismo de colesterol y la homeostasis de glucosa, respectivamente.

Hay estudios que muestran un papel de miR-143 en el desarrollo de la obesidad, ya que en adipocitos se produce una sobreexpresión de este miR en ratones alimentados con HFD durante 8 semanas [200]. Posteriormente, se demostró la sobreexpresión de este miR en el hígado de animales obesos [121]. En nuestros estudios, el *miR-143* presenta una expresión significativamente menor en ratones *Pask*^{-/-} con respecto a los controles en condiciones de alimentación con HFD. También se ha visto una correlación entre la expresión de este miR y el factor de transcripción *Pparγ* en adipocitos, que también presenta sobreexpresión en ratones alimentados con HFD [200]. Nuestros resultados confirman la sobreexpresión de *Pparγ* en el hígado de ratones controles con HFD, mientras que los *Pask*^{-/-} solo presentan un ligero aumento con respecto a SFD. Otra diferencia que explicaría la menor tendencia de ratones deficientes en PASK al desarrollo a la obesidad.

Por otro lado, se ha descrito que miR-143 controla la activación de Akt y la homeostasis de glucosa. Su expresión está relacionada con la resistencia a insulina, ya que la sobreexpresión de este miARN produce una inhibición de la activación de Akt por insulina y, por lo tanto, disminuye su actividad metabólica [121]. Los ratones *Pask*^{-/-} alimentados con SFD presentan una menor expresión de este miARN, lo que favorecería la sobreactivación de Akt, por lo que podría explicar que no desarrollen resistencia a insulina.

Con respecto a miR-33, se cree que podría estar relacionado, además de con el metabolismo de colesterol, con la oxidación de ácidos grasos y la señalización de insulina [126], tres factores con gran importancia en el desarrollo de síndrome metabólico. Investigaciones previas muestran que este miARN se expresa de forma abundante en hígado y cerebro y que su expresión disminuye con HFD [201]. Además, existe una relación inversa entre la expresión de *miR-33* y los niveles de colesterol. Nosotros podemos ver que la HFD disminuye la expresión de *miR-33* tanto en ayuno como en alimentación en ratones WT, sin embargo, este efecto fue revertido en ratones *Pask*^{-/-} presentando una expresión significativamente mayor con respecto a los controles, lo que podría estar relacionado con los menores niveles de colesterol encontrados en los ratones deficientes en PASK comparados con WT.

Asimismo, los ratones *miR-33*^{-/-} alimentados con HFD tienen mayor tendencia al desarrollo de obesidad e hígado graso [202], por lo que una razón de que los ratones *Pask*^{-/-} tengan menor probabilidad de desarrollar esteatosis hepática, podría estar relacionado con la sobreexpresión de miR-33. Los ratones deficientes en miR-33 alimentados con HFD, presentan alteración de los niveles de glucosa en sangre y disminución de la tolerancia a insulina, al igual que ocurre en los ratones controles con respecto a los *Pask*^{-/-}. Además, los ratones *miR-33*^{-/-} al desarrollar hígado graso presentan un mayor acúmulo de gotas lipídicas, como nosotros observamos en ratones WT mediante la tinción con Oil Red. Por lo tanto, la ausencia de alteraciones provocadas por HFD en ratones deficientes en PASK podría estar relacionada con el miR-33.

Por otra parte, hay datos que demuestran la localización de miR-33 en el intrón de SREBP1. Ratones KO para miR-33 presentan un aumento en la expresión de este factor de

Discusión

transcripción en el hígado, de modo que ambos presentan una regulación inversa [202]. Con SFD, los ratones WT presentan una mayor expresión de *miR-33* mientras que la expresión de SREBP1 es menor, sin embargo, en ratones *Pask*^{-/-} ocurre lo contrario. Del mismo modo, se ha visto que *miR-33* tiene como diana a la enzima CPT1. Existiendo una relación inversa entre ambos, ya que *miR-33* suprime los niveles de proteína CPT1. [203]. Nosotros analizamos ambos a nivel de expresión génica y pudimos observar una relación inversa en condiciones de alimentación, aunque los resultados no son estadísticamente significativos.

Teniendo en cuenta estos resultados, estos dos miARNs estarían involucrados en la regulación de enzimas y factores de transcripción del metabolismo lipídico y glucídico a nivel hepático. Además, la deficiencia de PASK altera la regulación de genes llevada a cabo por ambos miR en condiciones de alimentación con dietas ricas en grasa, es decir, PASK puede actuar como un mediador en la expresión de miRNAs regulada por HFD o en la adaptación a condiciones de ayuno/alimentación.

7 MITOCONDRIAS Y PASK

La estructura, la biogénesis y la función mitocondrial se encuentran alteradas con la diabetes, por lo que la disfunción mitocondrial se asocia a la resistencia a insulina. Una reducción en el número de mitocondrias y alteración de su localización y morfología se producen debido a la resistencia a esta hormona [204].

Además, el consumo de una dieta con alto contenido en grasas altera las proteínas relacionadas con el transporte, la biogénesis y la morfología mitocondrial. Este tipo de dieta provoca condensación y aumento de las criptas mitocondriales y las mitocondrias son más pequeñas y con una matriz más oscura [154]. También, se ha visto que la dieta HFD produce una disminución en los niveles de DNA mitocondrial hepático (mtDNA) [194].

En nuestros experimentos nos centramos en evaluar el número de mitocondrias hepáticas y ver si la deficiencia de PASK o la HFD podrían tener algún efecto sobre la cantidad de este orgánulo en el hígado. Observamos que ratones *Pask*^{-/-} presentan un menor número de mitocondrias. En investigaciones previas [111], no observaron diferencias en el número de mitocondrias entre ambos tipos de ratones.

Con respecto al efecto de la HFD, en ratones WT no observamos diferencias en el número de mitocondrias entre SFD y HFD, sin embargo, en ratones *Pask*^{-/-}, HFD provocó un ligero aumento con respecto SFD, aunque este resultado no llegó a ser significativo.

Todos los parámetros estudiados indican que la deficiencia de PASK regula genes y proteínas del metabolismo de glucosa y altera la señalización a insulina. Sin embargo, protege de las alteraciones provocados por HFD, mejorando la respuesta a ayuno/alimentación.

CONCLUSIONES

1. La expresión de PASK en el hígado se encuentra regulada por condiciones metabólicas, suprimiéndose durante el ayuno y esta regulación se encuentra alterada por dietas ricas en grasa. Asimismo, la Ex4 provoca un bloqueo de la expresión de PASK.
2. La deficiencia de PASK afecta a la funcionalidad y expresión de las proteínas GCK y GCKR a nivel hepático y esto podría contribuir a la desregulación del metabolismo de glucosa.
3. PASK participa en la respuesta del metabolismo hepático a los cambios de los estados nutricionales, ya que su carencia desregula a los factores de transcripción y enzimas claves del metabolismo hepático que responden al ayuno y a la alimentación.
4. PASK tiene un papel importante en el metabolismo de lípidos, ya que su carencia disminuye la expresión de enzimas lipogénicas, y es requerida para una completa acción de la insulina sobre la maduración proteolítica de SREBP1c.
5. Los tratamientos con Exendina-4 alteran la regulación por ayuno/alimentación de algunos factores de transcripción y enzimas metabólicas hepáticas. Sin embargo, PASK no media la acción de este análogo del GLP-1 sobre la mayor parte de los componentes de las rutas metabólicas.
6. La deficiencia de PASK revierte las alteraciones metabólicas hepáticas a la adaptación ayuno/alimentación ocasionadas por una dieta rica en grasa (HFD), recuperando la regulación normal fisiológica de los factores de transcripción y enzimas alterados por esta dieta. Por lo tanto, los ratones deficientes en PASK están protegidos de las alteraciones provocadas por HFD mejorando la respuesta a glucosa y a insulina y la adaptación a condiciones de ayuno y alimentación.
7. La expresión de miR-33 (involucrado en la regulación de enzimas y factores de transcripción del metabolismo lipídico y glucídico a nivel hepático) es inhibida por dietas

Conclusiones

de alto contenido graso y la deficiencia de PASK revierte este efecto manteniendo la expresión en los niveles normales que se encontraban con la dieta estándar. Por tanto, PASK puede actuar como modulador de los mecanismos de regulación postranscripcionales que son alteradas por HFD o por cambios nutricionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Michael, M.D., R.N. Kulkarni, C. Postic, et al., *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 87-97.
2. Rutter, G.A., *Diabetes: the importance of the liver*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. R736-8.
3. Postic, C., R. Dentin, and J. Girard, *Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis*. Diabetes Metab, 2004. **30**(5): p. 398-408.
4. Mueckler, M., *Facilitative glucose transporters*. Eur J Biochem, 1994. **219**(3): p. 713-25.
5. Thorens, B. and M. Mueckler, *Glucose transporters in the 21st Century*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(2): p. E141-5.
6. Leloup, C., M. Arluison, N. Lepetit, et al., *Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei*. Brain Res, 1994. **638**(1-2): p. 221-6.
7. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
8. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
9. Jiang, G. and B.B. Zhang, *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(4): p. E671-8.
10. Reddy, J.K. and M.S. Rao, *Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(5): p. G852-8.
11. Salter, A.M. and E.J. Tarling, *Regulation of gene transcription by fatty acids*. Animal, 2007. **1**(9): p. 1314-20.
12. Jitrapakdee, S., *Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(1): p. 33-45.
13. Yabaluri, N. and M.D. Bashyam, *Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver*. J Biosci, 2010. **35**(3): p. 473-84.
14. Michan, S. and D. Sinclair, *Sirtuins in mammals: insights into their biological function*. Biochem J, 2007. **404**(1): p. 1-13.
15. Michishita, E., J.Y. Park, J.M. Burneskis, J.C. Barrett, and I. Horikawa, *Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4623-35.
16. Chang, H.C. and L. Guarente, *SIRT1 and other sirtuins in metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(3): p. 138-45.
17. Hanson, R.W. and L. Reshef, *Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 581-611.
18. Barzilai, N. and L. Rossetti, *Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin*. J Biol Chem, 1993. **268**(33): p. 25019-25.
19. Puigserver, P. and B.M. Spiegelman, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator*. Endocr Rev, 2003. **24**(1): p. 78-90.
20. Nemoto, S., M.M. Fergusson, and T. Finkel, *SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 16456-60.
21. Rodgers, J.T., C. Lerin, W. Haas, et al., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 113-8.
22. Matsuzaki, H., H. Daitoku, M. Hatta, et al., *Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(32): p. 11278-83.
23. Hannenhalli, S. and K.H. Kaestner, *The evolution of Fox genes and their role in development and disease*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(4): p. 233-40.

Bibliografia

24. Daitoku, H., J. Sakamaki, and A. Fukamizu, *Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(11): p. 1954-60.
25. Daitoku, H., M. Hatta, H. Matsuzaki, et al., *Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10042-7.
26. Frescas, D., L. Valenti, and D. Accili, *Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20589-95.
27. Brunet, A., L.B. Sweeney, J.F. Sturgill, et al., *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2011-5.
28. Puigserver, P., J. Rhee, J. Donovan, et al., *Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 550-5.
29. Rinaldo, P., D. Matern, and M.J. Bennett, *Fatty acid oxidation disorders*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 477-502.
30. McGarry, J.D. and N.F. Brown, *The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis*. Eur J Biochem, 1997. **244**(1): p. 1-14.
31. McGarry, J.D., G.P. Mannaerts, and D.W. Foster, *A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis*. J Clin Invest, 1977. **60**(1): p. 265-70.
32. Kersten, S., B. Desvergne, and W. Wahli, *Roles of PPARs in health and disease*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 421-4.
33. Rhee, J., Y. Inoue, J.C. Yoon, et al., *Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4012-7.
34. Brown, J.D. and J. Plutzky, *Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets*. Circulation, 2007. **115**(4): p. 518-33.
35. Rodgers, J.T. and P. Puigserver, *Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12861-6.
36. Inoue, H., *Central insulin-mediated regulation of hepatic glucose production [Review]*. Endocr J, 2016. **63**(1): p. 1-7.
37. Pocai, A., S. Obici, G.J. Schwartz, and L. Rossetti, *A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis*. Cell Metab, 2005. **1**(1): p. 53-61.
38. Wu, C., S.A. Khan, and A.J. Lange, *Regulation of glycolysis-role of insulin*. Exp Gerontol, 2005. **40**(11): p. 894-9.
39. Dentin, R., J. Girard, and C. Postic, *Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 81-6.
40. Wakil, S.J., J.K. Stoops, and V.C. Joshi, *Fatty acid synthesis and its regulation*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 537-79.
41. Abu-Elheiga, L., M.M. Matzuk, K.A. Abo-Hashema, and S.J. Wakil, *Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2*. Science, 2001. **291**(5513): p. 2613-6.
42. Wakil, S.J., *Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme*. Biochemistry, 1989. **28**(11): p. 4523-30.
43. Miyazaki, M., M.J. Jacobson, W.C. Man, et al., *Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33904-11.
44. Cohen, P., M. Miyazaki, N.D. Socci, et al., *Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss*. Science, 2002. **297**(5579): p. 240-3.

45. Willy, P.J., K. Umesono, E.S. Ong, et al., *LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway*. Genes Dev, 1995. **9**(9): p. 1033-45.
46. Yoshikawa, T., H. Shimano, M. Amemiya-Kudo, et al., *Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(9): p. 2991-3000.
47. Yoshikawa, T., T. Ide, H. Shimano, et al., *Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(7): p. 1240-54.
48. Joseph, S.B., B.A. Laffitte, P.H. Patel, et al., *Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11019-25.
49. Horton, J.D., Y. Bashmakov, I. Shimomura, and H. Shimano, *Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 5987-92.
50. Yamamoto, T., H. Shimano, Y. Nakagawa, et al., *SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12027-35.
51. Ponugoti, B., D.H. Kim, Z. Xiao, et al., *SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism*. J Biol Chem, 2010. **285**(44): p. 33959-70.
52. Shimomura, I., Y. Bashmakov, and J.D. Horton, *Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30028-32.
53. Picard, F., M. Kurtev, N. Chung, et al., *Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma*. Nature, 2004. **429**(6993): p. 771-6.
54. Tripathy, D., K.F. Eriksson, M. Orho-Melander, et al., *Parallel manifestation of insulin resistance and beta cell decompensation is compatible with a common defect in Type 2 diabetes*. Diabetologia, 2004. **47**(5): p. 782-93.
55. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
56. Kerouz, N.J., D. Horsch, S. Pons, and C.R. Kahn, *Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3164-72.
57. Saad, M.J., E. Araki, M. Miralpeix, et al., *Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance*. J Clin Invest, 1992. **90**(5): p. 1839-49.
58. Franke, T.F., C.P. Hornik, L. Segev, G.A. Shostak, and C. Sugimoto, *PI3K/Akt and apoptosis: size matters*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 8983-98.
59. Horio, Y., *Diabetes: insulin signal meets SIRT1 at AKT*. Nat Rev Endocrinol, 2011. **8**(3): p. 131-2.
60. Sundaresan, N.R., V.B. Pillai, D. Wolfgeher, et al., *The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy*. Sci Signal, 2011. **4**(182): p. ra46.
61. Ramakrishnan, G., G. Davaakhuu, L. Kaplun, et al., *Sirt2 deacetylase is a novel AKT binding partner critical for AKT activation by insulin*. J Biol Chem, 2014. **289**(9): p. 6054-66.
62. Markman, B., R. Dienstmann, and J. Tabernero, *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs*. Oncotarget, 2010. **1**(7): p. 530-43.
63. Demuro, G. and S. Obici, *Central nervous system and control of endogenous glucose production*. Curr Diab Rep, 2006. **6**(3): p. 188-93.
64. Dentin, R., J.P. Pegorier, F. Benhamed, et al., *Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(19): p. 20314-26.

65. Ilyedjian, P.B., *Mammalian glucokinase and its gene*. Biochem J, 1993. **293** (Pt 1): p. 1-13.
66. Walker, D.G. and S. Rao, *The role of glucokinase in the phosphorylation of glucose by rat liver*. Biochem J, 1964. **90**(2): p. 360-8.
67. Matschinsky, F.M. and J.E. Ellerman, *Metabolism of glucose in the islets of Langerhans*. J Biol Chem, 1968. **243**(10): p. 2730-6.
68. Magnuson, M.A. and K.D. Shelton, *An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell*. J Biol Chem, 1989. **264**(27): p. 15936-42.
69. Magnuson, M.A., T.L. Andreone, R.L. Printz, S. Koch, and D.K. Granner, *Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): p. 4838-42.
70. Roncero, I., E. Alvarez, P. Vazquez, and E. Blazquez, *Functional glucokinase isoforms are expressed in rat brain*. J Neurochem, 2000. **74**(5): p. 1848-57.
71. Bedoya, F.J., F.M. Matschinsky, T. Shimizu, J.J. O'Neil, and M.C. Appel, *Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat*. J Biol Chem, 1986. **261**(23): p. 10760-4.
72. Ilyedjian, P.B., *Molecular physiology of mammalian glucokinase*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(1): p. 27-42.
73. Roth, U., K. Jungermann, and T. Kietzmann, *Activation of glucokinase gene expression by hepatic nuclear factor 4alpha in primary hepatocytes*. Biochem J, 2002. **365**(Pt 1): p. 223-8.
74. Hirota, K., J. Sakamaki, J. Ishida, et al., *A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding*. J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32432-41.
75. Kim, S.Y., H.I. Kim, T.H. Kim, et al., *SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30823-9.
76. Agius, L., *Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism*. Biochem J, 2008. **414**(1): p. 1-18.
77. Tippet, P.S. and K.E. Neet, *An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A*. J Biol Chem, 1982. **257**(21): p. 12846-52.
78. Veiga-da-Cunha, M., L.Z. Xu, Y.H. Lee, et al., *Effect of mutations on the sensitivity of human beta-cell glucokinase to liver regulatory protein*. Diabetologia, 1996. **39**(10): p. 1173-9.
79. de la Iglesia, N., M. Veiga-da-Cunha, E. Van Schaftingen, J.J. Guinovart, and J.C. Ferrer, *Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase*. FEBS Lett, 1999. **456**(2): p. 332-8.
80. Van Schaftingen, E., M. Detheux, and M. Veiga da Cunha, *Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein*. FASEB J, 1994. **8**(6): p. 414-9.
81. Massa, M.L., J.J. Gagliardino, and F. Francini, *Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity*. IUBMB Life, 2011. **63**(1): p. 1-6.
82. Kaminski, M.T., J. Schultz, R. Waterstradt, et al., *Glucose-induced dissociation of glucokinase from its regulatory protein in the nucleus of hepatocytes prior to nuclear export*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(3): p. 554-64.
83. Van Schaftingen, E., *A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate*. Eur J Biochem, 1989. **179**(1): p. 179-84.
84. Farrelly, D., K.S. Brown, A. Tieman, et al., *Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14511-6.
85. Mukhtar, M.H., V.A. Payne, C. Arden, et al., *Inhibition of glucokinase translocation by AMP-activated protein kinase is associated with phosphorylation of both GKR and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(3): p. R766-74.

86. Park, J.M., T.H. Kim, S.H. Jo, M.Y. Kim, and Y.H. Ahn, *Acetylation of glucokinase regulatory protein decreases glucose metabolism by suppressing glucokinase activity*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17395.
87. Payne, V.A., C. Arden, C. Wu, A.J. Lange, and L. Agius, *Dual role of phosphofructokinase-2/fructose biphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 1949-57.
88. Grupe, A., B. Hultgren, A. Ryan, et al., *Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis*. Cell, 1995. **83**(1): p. 69-78.
89. Niswender, K.D., M. Shiota, C. Postic, A.D. Cherrington, and M.A. Magnuson, *Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22570-5.
90. Matschinsky, F.M., M.A. Magnuson, D. Zelent, et al., *The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 1-12.
91. Bali, D., A. Svetlanov, H.W. Lee, et al., *Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene*. J Biol Chem, 1995. **270**(37): p. 21464-7.
92. Mevorach, M., A. Giacca, Y. Aharon, et al., *Regulation of endogenous glucose production by glucose per se is impaired in type 2 diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 744-53.
93. Basu, A., R. Basu, P. Shah, et al., *Type 2 diabetes impairs splanchnic uptake of glucose but does not alter intestinal glucose absorption during enteral glucose feeding: additional evidence for a defect in hepatic glucokinase activity*. Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1351-62.
94. Caro, J.F., S. Triester, V.K. Patel, et al., *Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes*. Horm Metab Res, 1995. **27**(1): p. 19-22.
95. Haeusler, R.A., S. Camastra, B. Astiarraga, et al., *Decreased expression of hepatic glucokinase in type 2 diabetes*. Mol Metab, 2015. **4**(3): p. 222-6.
96. Hao, H.X. and J. Rutter, *The role of PAS kinase in regulating energy metabolism*. IUBMB Life, 2008. **60**(4): p. 204-9.
97. Schlafli, P., E. Bortner, P. Spielmann, and R.H. Wenger, *The PAS-domain kinase PASKIN: a new sensor in energy homeostasis*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(5): p. 876-83.
98. Gong, W., B. Hao, S.S. Mansy, et al., *Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15177-82.
99. Amezcua, C.A., S.M. Harper, J. Rutter, and K.H. Gardner, *Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation*. Structure, 2002. **10**(10): p. 1349-61.
100. Johnson, L.N., M.E. Noble, and D.J. Owen, *Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation*. Cell, 1996. **85**(2): p. 149-58.
101. Kikani, C.K., S.A. Antonyamy, J.B. Bonanno, et al., *Structural bases of PAS domain-regulated kinase (PASK) activation in the absence of activation loop phosphorylation*. J Biol Chem, 2010. **285**(52): p. 41034-43.
102. Grose, J.H. and J. Rutter, *The role of PAS kinase in PASSing the glucose signal*. Sensors (Basel), 2010. **10**(6): p. 5668-82.
103. da Silva Xavier, G., H. Farhan, H. Kim, et al., *Per-arnt-sim (PAS) domain-containing protein kinase is downregulated in human islets in type 2 diabetes and regulates glucagon secretion*. Diabetologia, 2011. **54**(4): p. 819-27.
104. da Silva Xavier, G., J. Rutter, and G.A. Rutter, *Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8319-24.

Bibliografia

105. Semache, M., B. Zarrouki, G. Fontes, et al., *Per-Arnt-Sim kinase regulates pancreatic duodenal homeobox-1 protein stability via phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β in pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(34): p. 24825-33.
106. Semplici, F., A. Mondragon, B. Macintyre, et al., *Cell type-specific deletion in mice reveals roles for PAS kinase in insulin and glucagon production*. Diabetologia, 2016. **59**(9): p. 1938-47.
107. Hurtado-Carneiro, V., I. Roncero, S.S. Egger, et al., *PAS kinase is a nutrient and energy sensor in hypothalamic areas required for the normal function of AMPK and mTOR/S6K1*. Mol Neurobiol, 2014. **50**(2): p. 314-26.
108. Hurtado-Carneiro, V., I. Roncero, E. Blazquez, E. Alvarez, and C. Sanz, *PAS kinase as a nutrient sensor in neuroblastoma and hypothalamic cells required for the normal expression and activity of other cellular nutrient and energy sensors*. Mol Neurobiol, 2013. **48**(3): p. 904-20.
109. Wilson, W.A., A.V. Skurat, B. Probst, et al., *Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16596-601.
110. Wu, X., D. Romero, W.I. Swiatek, et al., *PAS kinase drives lipogenesis through SREBP-1 maturation*. Cell Rep, 2014. **8**(1): p. 242-55.
111. Hao, H.X., C.M. Cardon, W. Swiatek, et al., *PAS kinase is required for normal cellular energy balance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(39): p. 15466-71.
112. Pauley, K.M. and E.K. Chan, *MicroRNAs and their emerging roles in immunology*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 226-39.
113. Rottiers, V. and A.M. Naar, *MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 239-50.
114. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
115. Lynn, F.C., *Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(9): p. 452-9.
116. El Ouaamari, A., N. Baroukh, G.A. Martens, et al., *miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2708-17.
117. Kloosterman, W.P., A.K. Lagendijk, R.F. Ketting, J.D. Moulton, and R.H. Plasterk, *Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development*. PLoS Biol, 2007. **5**(8): p. e203.
118. Vinod, M., J.V. Patankar, V. Sachdev, et al., *MiR-206 is expressed in pancreatic islets and regulates glucokinase activity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2016. **311**(1): p. E175-85.
119. Esau, C.C. and B.P. Monia, *Therapeutic potential for microRNAs*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(2-3): p. 101-14.
120. Esau, C., X. Kang, E. Peralta, et al., *MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52361-5.
121. Jordan, S.D., M. Kruger, D.M. Willmes, et al., *Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 434-46.
122. Najafi-Shoushtari, S.H., F. Kristo, Y. Li, et al., *MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis*. Science, 2010. **328**(5985): p. 1566-9.
123. Wilfred, B.R., W.X. Wang, and P.T. Nelson, *Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways*. Mol Genet Metab, 2007. **91**(3): p. 209-17.
124. Xie, H., B. Lim, and H.F. Lodish, *MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity*. Diabetes, 2009. **58**(5): p. 1050-7.
125. Xie, H., L. Sun, and H.F. Lodish, *Targeting microRNAs in obesity*. Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(10): p. 1227-38.

126. Davalos, A., L. Goedeke, P. Smibert, et al., *miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9232-7.
127. Rayner, K.J., F.J. Sheedy, C.C. Esau, et al., *Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis*. J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2921-31.
128. Trajkovski, M., J. Hausser, J. Soutschek, et al., *MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 649-53.
129. Prakash, T.P. and B. Bhat, *2'-Modified oligonucleotides for antisense therapeutics*. Curr Top Med Chem, 2007. **7**(7): p. 641-9.
130. Friedman, J.M., *Obesity in the new millennium*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 632-4.
131. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, *Obesity and the regulation of energy balance*. Cell, 2001. **104**(4): p. 531-43.
132. Palomo, I., M. Alarcon, R. Moore-Carrasco, and J.M. Argiles, *Hemostasis alterations in metabolic syndrome (review)*. Int J Mol Med, 2006. **18**(5): p. 969-74.
133. Giovannucci, E., *Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(3): p. s836-42.
134. Chalvon-Demersay, T., F. Blachier, D. Tome, and A. Blais, *Animal Models for the Study of the Relationships between Diet and Obesity: A Focus on Dietary Protein and Estrogen Deficiency*. Front Nutr, 2017. **4**: p. 5.
135. Speakman, J., C. Hambly, S. Mitchell, and E. Krol, *Animal models of obesity*. Obes Rev, 2007. **8 Suppl 1**: p. 55-61.
136. Rajeev, S.P. and J. Wilding, *GLP-1 as a target for therapeutic intervention*. Curr Opin Pharmacol, 2016. **31**: p. 44-49.
137. Bataille, D., K. Tatemoto, C. Gespach, et al., *Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum. Characterization of the peptide*. FEBS Lett, 1982. **146**(1): p. 79-86.
138. Holst, J.J., *The physiology of glucagon-like peptide 1*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1409-39.
139. Holst, J.J., M. Bersani, A.H. Johnsen, et al., *Proglucagon processing in porcine and human pancreas*. J Biol Chem, 1994. **269**(29): p. 18827-33.
140. Orskov, C., J.J. Holst, S. Knuhtsen, et al., *Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas*. Endocrinology, 1986. **119**(4): p. 1467-75.
141. Doyle, M.E. and J.M. Egan, *Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas*. Pharmacol Ther, 2007. **113**(3): p. 546-93.
142. Hansen, L., C.F. Deacon, C. Orskov, and J.J. Holst, *Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine*. Endocrinology, 1999. **140**(11): p. 5356-63.
143. Eissele, R., R. Goke, S. Willemer, et al., *Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man*. Eur J Clin Invest, 1992. **22**(4): p. 283-91.
144. Mayo, K.E., L.J. Miller, D. Bataille, et al., *International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(1): p. 167-94.
145. Campos, R.V., Y.C. Lee, and D.J. Drucker, *Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse*. Endocrinology, 1994. **134**(5): p. 2156-64.
146. Pratley, R.E. and M. Gilbert, *Targeting Incretins in Type 2 Diabetes: Role of GLP-1 Receptor Agonists and DPP-4 Inhibitors*. Rev Diabet Stud, 2008. **5**(2): p. 73-94.
147. Holst, J.J., T.W. Schwartz, N.A. Lovgreen, O. Pedersen, and H. Beck-Nielsen, *Diurnal profile of pancreatic polypeptide, pancreatic glucagon, gut glucagon and insulin in human morbid obesity*. Int J Obes, 1983. **7**(6): p. 529-38.

Bibliografia

148. Ding, X., N.K. Saxena, S. Lin, N.A. Gupta, and F.A. Anania, *Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice*. Hepatology, 2006. **43**(1): p. 173-81.
149. Sonmez, A., M. Dinc, A. Taslipinar, et al., *Add on Exenatide Treatment is Beneficial in Poorly Controlled Obese Type 2 Diabetics under Intensive Insulin Regimens*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2017. **125**(4): p. 256-261.
150. Katschinski, D.M., H.H. Marti, K.F. Wagner, et al., *Targeted disruption of the mouse PAS domain serine/threonine kinase PASKIN*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(19): p. 6780-9.
151. Chomczynski, P., *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. Biotechniques, 1993. **15**(3): p. 532-4, 536-7.
152. Hurtado-Carneiro, V., C. Sanz, I. Roncero, et al., *Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) can reverse AMP-activated protein kinase (AMPK) and S6 kinase (P70S6K) activities induced by fluctuations in glucose levels in hypothalamic areas involved in feeding behaviour*. Mol Neurobiol, 2012. **45**(2): p. 348-61.
153. Gilda, J.E. and A.V. Gomes, *Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots*. Anal Biochem, 2013. **440**(2): p. 186-8.
154. Guo, Y., M. Darshi, Y. Ma, et al., *Quantitative proteomic and functional analysis of liver mitochondria from high fat diet (HFD) diabetic mice*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(12): p. 3744-58.
155. Borter, E., M. Niessen, R. Zuellig, et al., *Glucose-stimulated insulin production in mice deficient for the PAS kinase PASKIN*. Diabetes, 2007. **56**(1): p. 113-7.
156. Hurtado-Carneiro, V., I. Roncero, E. Blazquez, E. Alvarez, and C. Sanz, *PAS Kinase as a Nutrient Sensor in Neuroblastoma and Hypothalamic Cells Required for the Normal Expression and Activity of Other Cellular Nutrient and Energy Sensors*. Molecular Neurobiology, 2013.
157. Bishay, R.H. and J.R. Greenfield, *A review of maturity onset diabetes of the young (MODY) and challenges in the management of glucokinase-MODY*. Med J Aust, 2016. **205**(10): p. 480-485.
158. Xu, J., S. Lin, R.W. Myers, et al., *Novel, highly potent systemic glucokinase activators for the treatment of Type 2 Diabetes Mellitus*. Bioorg Med Chem Lett, 2017. **27**(9): p. 2069-2073.
159. Shiota, M., C. Postic, Y. Fujimoto, et al., *Glucokinase gene locus transgenic mice are resistant to the development of obesity-induced type 2 diabetes*. Diabetes, 2001. **50**(3): p. 622-9.
160. de la Iglesia, N., M. Mukhtar, J. Seoane, J.J. Guinovart, and L. Agius, *The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10597-603.
161. Zhang, D.D., J.G. Zhang, Y.Z. Wang, et al., *Per-Arnt-Sim Kinase (PASK): An Emerging Regulator of Mammalian Glucose and Lipid Metabolism*. Nutrients, 2015. **7**(9): p. 7437-50.
162. Leavens, K.F., R.M. Easton, G.I. Shulman, S.F. Previs, and M.J. Birnbaum, *Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance*. Cell Metab, 2009. **10**(5): p. 405-18.
163. Benhamed, F., P.D. Denechaud, M. Lemoine, et al., *The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans*. J Clin Invest, 2012. **122**(6): p. 2176-94.
164. Ono, H., H. Shimano, H. Katagiri, et al., *Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement*. Diabetes, 2003. **52**(12): p. 2905-13.
165. Chen, G., G. Liang, J. Ou, J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11245-50.

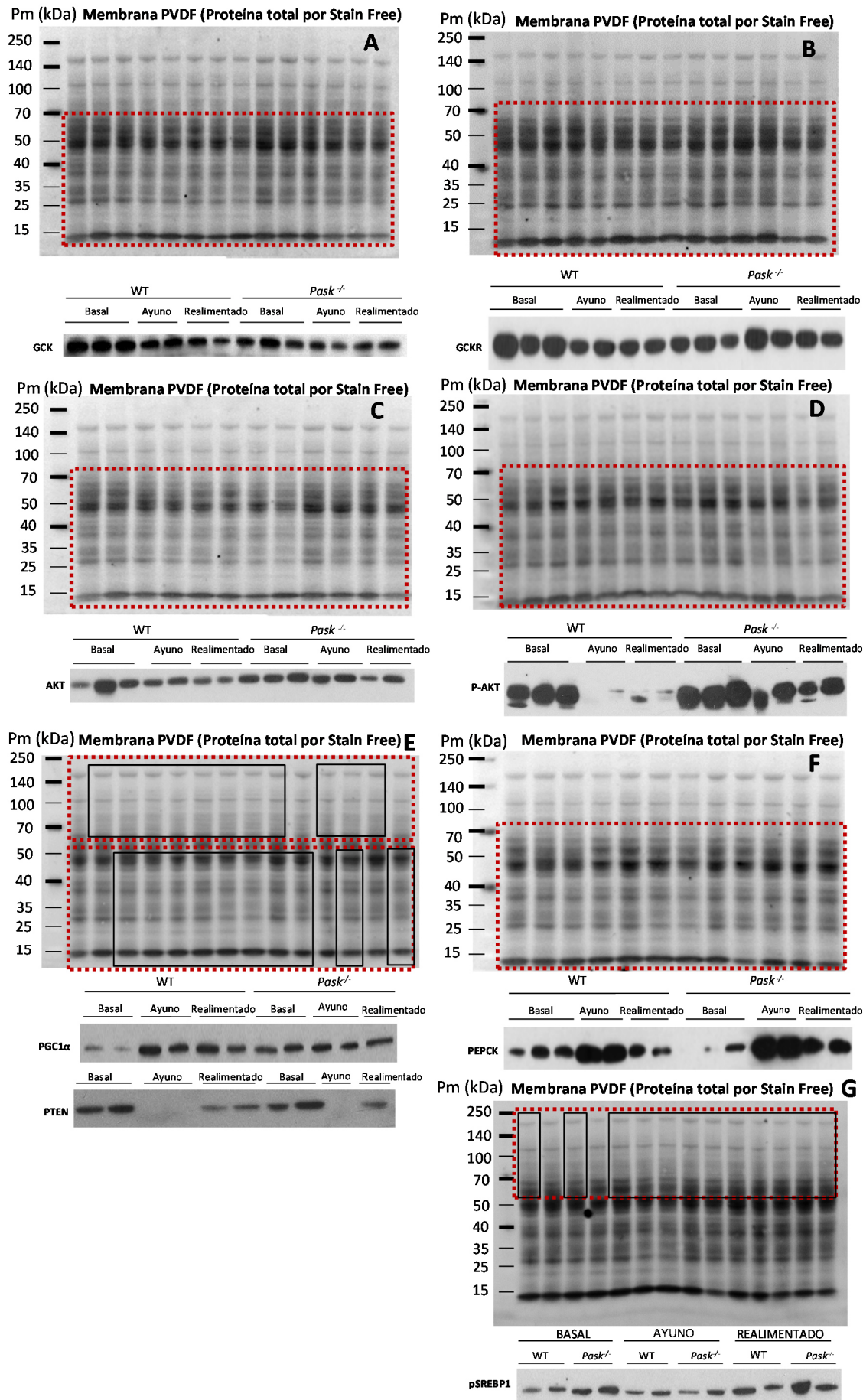
166. Hegarty, B.D., A. Bobard, I. Hainault, et al., *Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 791-6.
167. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. **67**: p. 491-8.
168. Fleischmann, M. and P.B. Iynedjian, *Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt*. Biochem J, 2000. **349**(Pt 1): p. 13-7.
169. Azzout-Marniche, D., D. Becard, C. Guichard, et al., *Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes*. Biochem J, 2000. **350 Pt 2**: p. 389-93.
170. Liang, G., J. Yang, J.D. Horton, et al., *Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9520-8.
171. Schadinger, S.E., N.L. Bucher, B.M. Schreiber, and S.R. Farmer, *PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(6): p. E1195-205.
172. Hansmannel, F., S. Mordier, and P.B. Iynedjian, *Insulin induction of glucokinase and fatty acid synthase in hepatocytes: analysis of the roles of sterol-regulatory-element-binding protein-1c and liver X receptor*. Biochem J, 2006. **399**(2): p. 275-83.
173. Kawaguchi, T., M. Takenoshita, T. Kabashima, and K. Uyeda, *Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13710-5.
174. Lin, H.V. and D. Accili, *Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease*. Cell Metab, 2011. **14**(1): p. 9-19.
175. Zhang, W., S. Patil, B. Chauhan, et al., *FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10105-17.
176. Purushotham, A., T.T. Schug, Q. Xu, et al., *Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation*. Cell Metab, 2009. **9**(4): p. 327-38.
177. Jiang, W., S. Wang, M. Xiao, et al., *Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase*. Mol Cell, 2011. **43**(1): p. 33-44.
178. Xiong, Y., Q.Y. Lei, S. Zhao, and K.L. Guan, *Regulation of glycolysis and gluconeogenesis by acetylation of PKM and PEPCK*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **76**: p. 285-9.
179. Zhao, S., W. Xu, W. Jiang, et al., *Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation*. Science, 2010. **327**(5968): p. 1000-4.
180. Hurtado-Carneiro, V., I. Roncero, E. Blazquez, E. Alvarez, and C. Sanz, *PAS Kinase as a Nutrient Sensor in Neuroblastoma and Hypothalamic Cells Required for the Normal Expression and Activity of Other Cellular Nutrient and Energy Sensors*. Molecular Neurobiology, 2013: p. 1-17.
181. Scrocchi, L.A., B.A. Marshall, S.M. Cook, P.L. Brubaker, and D.J. Drucker, *Identification of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) actions essential for glucose homeostasis in mice with disruption of GLP-1 receptor signaling*. Diabetes, 1998. **47**(4): p. 632-9.
182. Alvarez, E., M.D. Martinez, I. Roncero, et al., *The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem*. J Neurochem, 2005. **92**(4): p. 798-806.
183. Dhanesha, N., A. Joharapurkar, G. Shah, et al., *Exendin-4 reduces glycemia by increasing liver glucokinase activity: an insulin independent effect*. Pharmacol Rep, 2012. **64**(1): p. 140-9.

184. Hong, S.W., J. Lee, S.E. Park, et al., *Repression of sterol regulatory element-binding protein 1-c is involved in the protective effects of exendin-4 in pancreatic beta-cell line*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **362**(1-2): p. 242-52.
185. Day, C.P. and O.F. James, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology, 1998. **114**(4): p. 842-5.
186. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. Hepatology, 2010. **52**(5): p. 1836-46.
187. Yilmaz, Y., *Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions?* Aliment Pharmacol Ther, 2012. **36**(9): p. 815-23.
188. Gavrilova, O., M. Haluzik, K. Matsusue, et al., *Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34268-76.
189. Pettinelli, P. and L.A. Videla, *Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(5): p. 1424-30.
190. Higuchi, N., M. Kato, Y. Shundo, et al., *Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatol Res, 2008. **38**(11): p. 1122-9.
191. Dentin, R., F. Benhamed, I. Hainault, et al., *Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice*. Diabetes, 2006. **55**(8): p. 2159-70.
192. Kohjima, M., M. Enjoji, N. Higuchi, et al., *Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease*. Int J Mol Med, 2007. **20**(3): p. 351-8.
193. Mitsuyoshi, H., K. Yasui, Y. Harano, et al., *Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatol Res, 2009. **39**(4): p. 366-73.
194. Liu, H.Y., T. Hong, G.B. Wen, et al., *Increased basal level of Akt-dependent insulin signaling may be responsible for the development of insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(4): p. E898-906.
195. Stiles, B., Y. Wang, A. Stahl, et al., *Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected]*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2082-7.
196. Whiteman, E.L., H. Cho, and M.J. Birnbaum, *Role of Akt/protein kinase B in metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(10): p. 444-51.
197. Lee, J., J. Choi, E.S. Selen Alpergin, et al., *Loss of Hepatic Mitochondrial Long-Chain Fatty Acid Oxidation Confers Resistance to Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance*. Cell Rep, 2017. **20**(3): p. 655-667.
198. Jiang, M., Y. Zhang, M. Liu, et al., *Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet-induced obese rats*. Endocrinology, 2011. **152**(4): p. 1284-9.
199. Gorman, T., D.C. Hope, R. Brownlie, et al., *Effect of high-fat diet on glucose homeostasis and gene expression in glucokinase knockout mice*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(10): p. 885-97.
200. Takanabe, R., K. Ono, Y. Abe, et al., *Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **376**(4): p. 728-32.
201. Rayner, K.J., Y. Suarez, A. Davalos, et al., *Mir-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis*. Science, 2010. **328**(5985): p. 1570-3.
202. Horie, T., T. Nishino, O. Baba, et al., *MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2883.

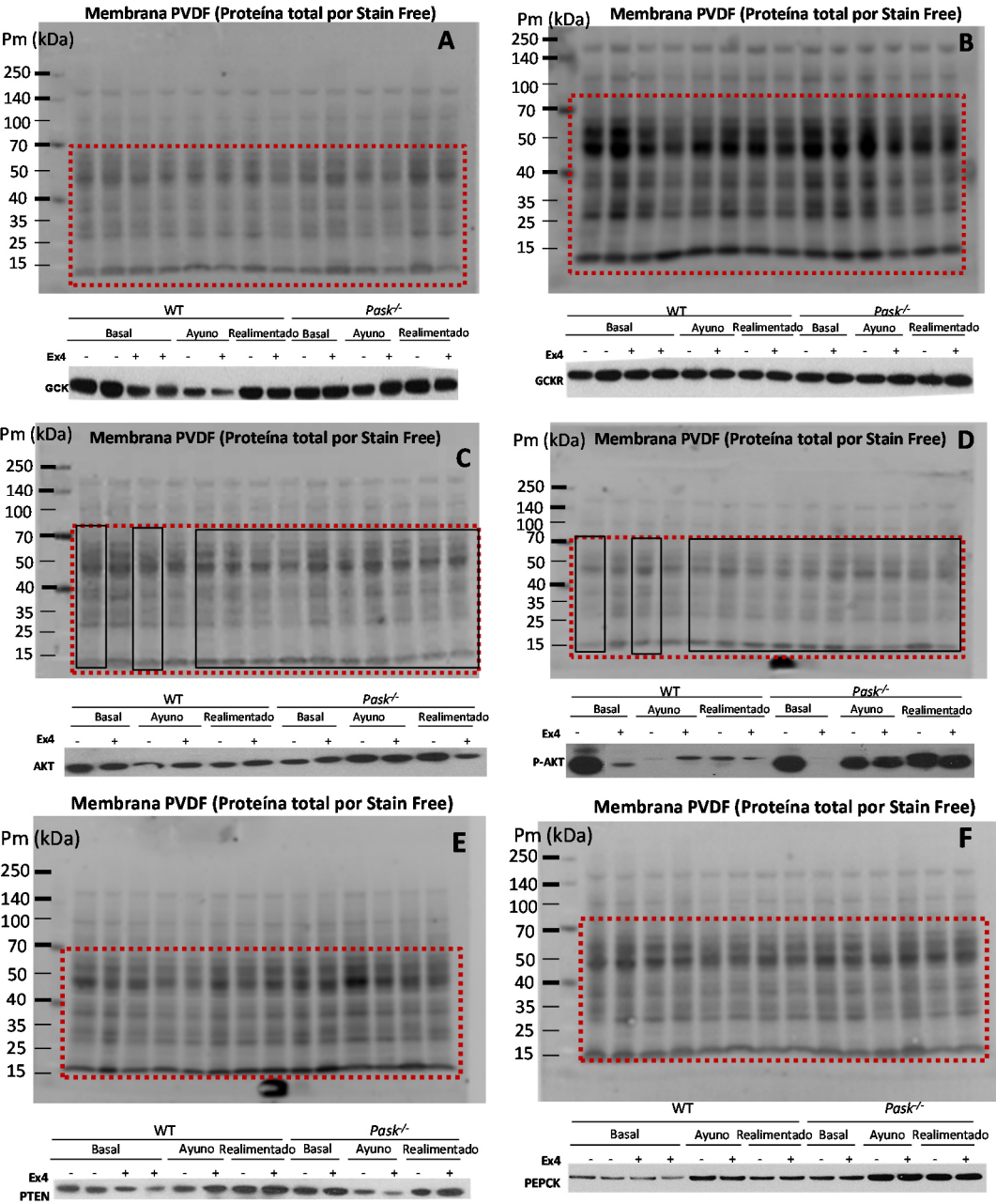
203. Gerin, I., L.A. Clerbaux, O. Haumont, et al., *Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation*. J Biol Chem, 2010. **285**(44): p. 33652-61.
204. Kelley, D.E., J. He, E.V. Menshikova, and V.B. Ritov, *Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 2944-50.

Figura suplementaria 1. Membranas de PVDF representativas para visualizar la proteína total y las diferencias de carga e imágenes de los blots finales empleados en los distintos experimentos. La proteína total fue detectada por luz ultravioleta en una membrana transferida desde un gel TGX Stain-Free™. Las diferencias entre las bandas fueron normalizadas por cuantificación de las proteínas de cada membrana. Las membranas de PVDF fueron cortadas (**línea roja**) para ahorrar el uso de una gran cantidad de anticuerpos, y después fueron incubadas con cada anticuerpo específico. Las regiones de las membranas incubadas corresponden al peso molecular de la proteína que quería ser detectada. Las cajas en las bandas corresponden a los blots cortados que aparecen en la figura principal. Los blots cortados finales se muestran como aparecen en la figura principal. **Anexo 1.** La figura recoge las membranas empleadas en la detección de las proteínas **(A)** GCK, **(B)** GCKR, **(C)** AKT, **(D)** P-AKT, **(E)** PTEN y PGC1 α , **(F)** PEPCK **(G)** pSREBP1 y los blots finales representativos de cada una de las proteínas de los Western Blot en los que los ratones estaban en condiciones de ayuno (48h), realimentación (3 h) o basal. **Anexo 2.** La figura recoge las membranas empleadas en la detección de las proteínas **(A)** GCK, **(B)** GCKR, **(C)** AKT, **(D)** P-AKT, **(E)** PTEN **(F)** PEPCK y los blots finales representativos de cada una de las proteínas de los Western Blot en los que los ratones fueron tratados con Exendina-4 (Ex4). **Anexo 3.** La figura recoge las membranas empleadas en la detección de las proteínas **(A)** GCK, **(B)** GCKR, **(C)** AKT, **(D)** P-AKT, **(E)** PTEN y PGC1 α **(F)** PEPCK y los blots finales representativos de cada una de las proteínas de los Western Blot en los que los ratones fueron alimentados con SFD o HFD.

Anexo 1



Anexo 2



Anexo 3

